

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. F. HOFSTÄDTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Reduzierte Expression der miRNA196a2 führt über den
Transkriptionsfaktor ERG zu einer Hochregulation der
Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* im malignen
Melanom**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephanie Wagner

2013

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. F. HOFSTÄDTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Reduzierte Expression der miRNA196a2 führt über den
Transkriptionsfaktor ERG zu einer Hochregulation der
Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* im malignen
Melanom**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephanie Wagner

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Anja K. Bosserhoff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lukas Prantl
Tag der mündlichen Prüfung:	06.08.2013

Meinen Eltern gewidmet

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression des Transkriptionsfaktors *ERG* (*Ets-related gen*) im malignen Melanom untersucht. In den untersuchten Melanomzelllinien konnten dabei zwei Subgruppen unterschieden werden. Während einige Zelllinien eine Überexpression zeigten, fand sich in anderen eine reduzierte *ERG* Expression.

Nun galt es, ein Zielgen von *ERG* zu identifizieren. Da die meisten Transkriptionsfaktoren der ETS Familie eine Aktivierung der Transkription ihrer Zielgene bewirken, wurde nach einem Gen gesucht, das im malignen Melanom verstärkt exprimiert vorliegt. Besonders geeignet schien die MAP Kinase Phosphatase *DUSP4* (*dual-specificity phosphatase*).

Einen ersten Hinweis auf eine Regulation von *DUSP4* durch *ERG* ergab die Identifizierung einer ETS Bindestelle im *DUSP4* Promotor. Um einen Vergleich mit *ERG* zu ermöglichen, wurde nun die Expression der beiden Transkriptionsvarianten von *DUSP4* im malignen Melanom untersucht. Dabei zeigte insbesondere die Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4*, als weiteren Hinweis auf eine Regulation durch *ERG*, ähnliche Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene. Die Transkriptionsvariante 2 von *DUSP4* dagegen wies eine deutlich geringere Hochregulation in den untersuchten Zelllinien als *ERG* auf. Somit wurde eine positive Regulation der Transkriptionsvariante 2 durch *ERG* ausgeschlossen.

Weiterhin gelang es, die miRNA196a2 als direkten negativen Regulator von *ERG* im malignen Melanom zu identifizieren. So konnten die Auswirkungen der durch die miRNA196a2 supprimierten *ERG* Expression auf die Expression von *DUSP4* in den Melanomzellen untersucht werden. Dabei zeigte sich ausschließlich eine Reduktion der Expression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4*, jedoch kein Effekt auf Transkriptionsvariante 2. Folglich konnte *ERG* als direkter positiver Regulator der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* identifiziert werden.

Insgesamt gelang es, mit der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* ein Zielgen von *ERG* und mit der miRNA196a2 einen negativen Regulator von *ERG* zu identifizieren. Berücksichtigt man, dass die miRNA196a2 im malignen Melanom vermindert exprimiert wird, so ist es gelungen, einen Weg zu identifizieren, beim dem die reduzierte Expression der miRNA196a2 über den Transkriptionsfaktor

ERG zu einer gesteigerten Expression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* führt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Malignes Melanom.....	1
1.1.1 Epidemiologie des malignen Melanoms.....	1
1.1.2 Ätiologische Faktoren	2
1.1.3 Klassifikation des malignen Melanoms	3
1.1.4 Prognose	4
1.1.5 Pathogenese des malignen Melanoms	5
1.2 ETS Transkriptionsfaktoren	7
1.2.1 Modulation der ETS Funktion	8
1.2.2 ETS Faktoren und Tumorerkrankungen.....	9
1.3 <i>Dual-specificity</i> Protein Phosphatasen (DUSPs).....	11
1.3.1 Klassifizierung der DUSPs.....	12
1.3.2 MAP Kinasen Signalwege und die Rolle der DUSPs	14
1.3.3 DUSPs und Tumorerkrankungen	15
1.4 MicroRNAs	17
1.4.1 Biogenese von microRNAs	17
1.4.2 Interaktion zwischen microRNA und Ziel-mRNA.....	19
1.4.3 MicroRNAs im malignen Melanom.....	20
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	22
2 Materialien und Methoden	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Allgemeine Materialien	24
2.1.2 Geräte	26
2.1.3 Bakterienstämme.....	27
2.1.4 Säugetierzelllinien	27
2.1.5 Vektoren	28
2.1.6 Oligonukleotide.....	28
2.1.7 Medien, Antibiotika, Puffer und Lösungen.....	29
2.2 Methoden	33
2.2.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	33
2.2.2 RNA-Techniken	35
2.2.3 DNA-Techniken	37
2.2.4 Proteinchemische Methoden	40
2.2.5 Zellkulturmethoden	44

2.2.6	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Expression des Transkriptionsfaktors ERG im malignen Melanom	46
3.2	Expression der <i>dual-specificity</i> Protein Phosphatase DUSP4 im malignen Melanom.....	49
3.3	Expression des Transkriptionsfaktors ERG in der mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Melanomzelllinie Mel Im	54
3.4	Expression der <i>dual-specificity</i> Protein Phosphatase DUSP4 in der reduziert <i>ERG</i> exprimierenden, mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Melanomzelllinie Mel Im	58
4	Diskussion.....	62
4.1	<i>ERG</i> Expression in Melanomzellen unterscheidet sich von der in gesunden Melanozyten	62
4.2	<i>DUSP4</i> als Zielgen von ERG im malignen Melanom.....	64
4.2.1	<i>DUSP4</i> wird durch ETS Faktoren reguliert.....	66
4.2.2	Expression von <i>DUSP4</i> im malignen Melanom.....	67
4.3	Expressions- und Promotoranalysen geben Hinweis auf eine direkte Regulation der Transkriptionsvariante 1 von <i>DUSP4</i> durch ERG im malignen Melanom	71
4.4	Reduzierte Expression der miRNA196a2 im malignen Melanom führt über ERG zu einer Hochregulation der Transkriptionsvariante 1 von <i>DUSP4</i>	72
4.4.1	miRNA196a2 als negativer Regulator von <i>ERG</i> im malignen Melanom	72
4.4.2	miRNA196a2 als indirekter Regulator der Transkriptionsvariante 1 von <i>DUSP4</i> im malignen Melanom.....	74
5	Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

AGO	Agonaute
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	akrolentiginöses malignes Mealnom
BCA	Bicinchonsäure
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DSP	dual-specificity phosphatase domain
DUSP	dual-specificity protein phosphatase
DUSP1/2/4/5/6/7/8/9/10/14/16/22/26	dual specificity phosphatase 1/2/4/5/6/7/8/9/10 14/16/22/26
EAP	Ets-associated proteins
EBS	Ets binding site
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELK1	Ets domain-containing protein Elk1
ERF	Ets2 repressor factor
ERG	Ets-related Gene
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ERK1/2/3/4/5/7/8	extracellular-signal regulated kinase 1/2/3/4/5/7/8
ETS1/2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1/2
EWS	Ewing sarcoma breakpoint region 1
FICT	Fluoresceinisothiocyanat
Fli1	friend leukemia virus integration 1
HRP	horseradish peroxidase
JNK	c-Jun amino-terminal kinase
JNK 1/2/3	c-Jun amino-terminal kinase 1/2/3
KIM	kinase interaction motif
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LMM	<i>Lentigo-maligna</i> -Melanom
LOH	loss of heterozygosity
MAPK	mitogen-activated protein kinase

miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNA196a2	microRNA196a2
miRNP	micro-ribonucleoprotein
MITF	microphthalmia transcription factor
MKB	MAPK-binding domain
MKK/ MEK	MAP kinase
MKP	mitogen-activated protein kinase phosphatase
MKP2	MAP Kinase Phosphatase 2
MMP	matrix metalloproteinase
NES	nuclear export signal
NHEM	normal human epidermal melanocytes
NLS	nuclear localization signal
NMM	noduläres malignes Melanom
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PCR	polymerase chain reaction
PEST	peptid sequence rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S) and threonine (T)
PNT	pointed domain
PU.1	SPI1 – spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogen spi1
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
Ras	rat sarcoma
RPG	radial initial growth phase
RRE	ras-responsive element
SDS	sodium dodecyl sulfate
SRE	serum-responsive element
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
TEL	ETV6 - ets variant gene 6 (TEL oncogen)
TGFβ	transforming growth factor beta-1
TRBP	TAR RNA binding protein
UICC	Union internationale contre le cancer
VGP	vertical growth phase

1 Einleitung

1.1 Malignes Melanom

Das maligne Melanom ist ein hochgradig bösartiger Tumor der Pigmentzellen der Haut, der Melanozyten. Er neigt zu einer frühen Metastasierung über Lymph- und Blutbahnen und ist damit die am häufigsten tödlich verlaufende Hauterkrankung der weißen Bevölkerung weltweit. Die Anzahl an Neuerkrankungen steigt zudem stetig an. Neben der Manifestation auf der Haut, dem sogenannten kutanen Melanom, gibt es noch die Gruppe der wesentlich seltener vorkommenden mukosalen Melanome. Dazu zählen maligne Melanome der Schleimhäute, des Auges (Aderhautmelanom), des Zentralnervensystems, der inneren Organe und des Anus (anorektales Melanom).

1.1.1 Epidemiologie des malignen Melanoms

Das maligne Melanom betrifft vorwiegend die weiße Bevölkerung und ist unter Afrikanern und Asiaten selten. Unter den letzten beiden Bevölkerungsgruppen ist die Inzidenz mit 0,4 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr konstant. Dabei sind vorwiegend nicht UV-exponierte Körperregionen betroffen.

Bei Weißen hingegen ist die Inzidenz des Melanoms abhängig von der UV-Belastung und folglich der geographischen Region. Hier zählt das maligne Melanom zu den Tumoren mit der am schnellsten ansteigenden Inzidenz. Der jährliche Zuwachs liegt zwischen 4 und 8%, das entspricht einer Verdoppelung alle 10-15 Jahre und damit einer enormen Erhöhung des Lebenszeitriskos. Unter der weißen Bevölkerung in Europa und Nordamerika liegt die Häufigkeit der Neuerkrankungen bei 13 bis 15 pro 100 000 Einwohner pro Jahr (Garbe and Leiter, 2009). Das Lebenszeitrisko beträgt circa 1:75.

In Deutschland werden aktuell 18 000 Neuerkrankungen pro Jahr verzeichnet (Fos, 2012). Insgesamt sterben hier jährlich circa 3 000 Menschen an Hautkrebs, dabei vier von fünf an den Folgen des malignen Melanoms (Fos, 2012).

Insgesamt sind Frauen vom schwarzen Hautkrebs ungefähr 1,5 mal häufiger betroffen als Männer, zeigen aber im Vergleich dagegen einen mildereren Verlauf der Erkrankung. Prinzipiell kann das Melanom in jedem Alter auftreten. Kinder und

Jugendliche unter 20 Jahren sind jedoch mit einem Anteil von circa 2% aller Erkrankten sehr selten betroffen. 80% der Melanome entstehen zwischen dem 30. und dem 70. Lebensjahr, wobei das mittlere Erkrankungsalter von Frauen bei 58 und von Männern bei 64 Jahren liegt. Das Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter, vermutlich auf Grund der progredient absinkenden *Repair*-Kapazität der Zellen, exponentiell an. Melanome vom *Lentigo-maligna* Typ haben ihre höchste Inzidenz im 9. Lebensjahrzehnt (Garbe and Leiter, 2009).

1.1.2 Ätiologische Faktoren

Der wichtigste ätiologische Faktor beim Melanom ist die Exposition gegenüber UV-Licht. Dies geht aus der Korrelation der geographischen Inzidenz mit der UV-Belastung, des seltenen Vorkommens bei der dunklen Bevölkerung und der Häufung bei lichtempfindlichen Personen mit hellem Hauttyp hervor. Der enorme Anstieg der Melanominzidenz lässt sich unter anderem auf geänderte Lebens- und Freizeitgewohnheiten zurückführen.

Die Verteilung der Melanome am Körper korreliert allerdings nur schlecht mit der kumulativen UV-Exposition. An Körperteilen die regelmäßig dem Sonnenlicht ausgesetzt sind, finden sich meist Melanome vom *Lentigo-maligna* Typ. Andere Subtypen der Melanome sind bevorzugt an den weniger UV-exponierten Körperregionen lokalisiert. Allerdings korreliert die Inzidenz der Melanome mit der Anzahl an erlittenen schweren Sonnenbränden. Besonders negativ wirken sich schwere Sonnenbrände während der Kindheit und Pubertät aus.

Auch Störungen der DNA-Reparatur, wie beispielsweise im Rahmen einer Xeroderma pigmentosum, spielen eine Rolle.

Einen weiteren Risikofaktor stellt die genetische Prädisposition dar. Bei 10% der Melanome findet sich eine familiäre Häufung, der ein autosomal dominanter Erbgang, allerdings mit unregelmäßiger Penetranz, zu Grunde liegt. Es konnten mehrere Subzeptibilitätsgene identifiziert werden. Diese haben jedoch nur eine relativ niedrige Auswirkung auf das Risiko ein Melanom zu entwickeln.

Ätiologisch spielen bei der Entstehung des malignen Melanoms Präkursorläsionen eine Rolle. Ungefähr 20-30% der Melanome entstehen aus dysplastischen Nävi, 10% aus kongenitalen Nävi, der Großteil jedoch entsteht auf unveränderter Haut. Das Risiko ein Melanom zu entwickeln korreliert stark mit der Anzahl erworbener

Nävi und ist bei Patienten mit 50 Nävi über einem Durchmesser von 2 mm auf das 64-fache erhöht. Für Patienten mit dysplastischen Nävi steigt das Risiko, ein malignes Melanom zu entwickeln von 0,8% auf 18% an (Garbe und Leiter, 2008).

1.1.3 Klassifikation des malignen Melanoms

Anhand von klinischen und histopathologischen Kriterien können vier Subtypen des malignen Melanoms unterschieden werden. Dazu zählen das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das primär noduläre maligne Melanom (NMM), das *Lentigo-maligna*-Melanom (LMM) und das akrolentiginöse maligne Melanom (ALM).

Das superfiziell spreitende Melanom ist mit 60% der häufigste Subtyp und insbesondere an Rücken, Brust und Extremitäten lokalisiert. Es wächst langsam über einen Zeitraum von circa zwei bis vier Jahren und breitet sich zunächst horizontal in der Hautebene aus. Dies ermöglicht die Erkennung von prognostisch günstigen Frühformen, wie dem *Melanoma in situ*, bei dem die Tumorzellen ausschließlich in der Epidermis, der obersten Hautschicht, lokalisiert sind. Danach kommt es zu einem vertikalen Wachstum und der Ausbildung von Erhabenheit. Makroskopisch imponiert es als scharf begrenzter von weißgrau über rosa bis blauschwarz pigmentierter Tumor mit teils knotigen Anteilen.

Das noduläre maligne Melanom macht circa 20% aller Melanome aus und ist wie das SSM bevorzugt an Rücken, Brust und Extremitäten lokalisiert. Es ist die aggressivste Form des Melanoms und entsteht entweder *de novo* auf gesunder Haut oder aus einem pigmentierten Nävus innerhalb relativ kurzer Zeit (Monate bis zwei Jahre). Dies ist auf das relativ schnelle vertikale Wachstum und die frühzeitige Metastasierung über die Blut- und Lymphbahnen zurückzuführen. Noduläre Melanome sind meist von brauner bis tiefschwarzer Farbe und können sowohl eine glatte als auch eine ulzerierte Oberfläche mit starker Blutungsneigung aufweisen.

10% der Melanome gehören zum *Lentigo-maligna* Subtyp und sind bevorzugt auf sonnenexponierten Hautarealen lokalisiert. Sie entstehen auf dem Boden einer *Lentigo maligna*, einer präkanzerotischen Hauterkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters, mit intraepidermalen neoplastischen Proliferationen atypischer Melanozyten. Charakteristisch ist ein sehr langsames, zunächst radiales und horizontales Wachstum, das erst nach bis zu 15 Jahren in ein vertikales

Wachstum übergeht. Makroskopisch zeigen sich große, teils erhabene, unregelmäßige Flecken.

4% der Melanome entstehen bevorzugt an Handinnenflächen, Fußsohlen und unter den Nägeln und werden zu den akrolentiginösen malignen Melanomen gezählt. Es ist dem *Lentigo-maligna*-Melanom makroskopisch sehr ähnlich, wächst aber deutlich schneller und aggressiver und ist damit auch prognostisch ungünstiger. Es handelt sich um den häufigsten Melanomtyp dunkelhäutiger und asiatischer Völker.

5% der Melanome sind Sonderformen, zu denen neben weiteren auch das amelanotische maligne Melanom (AMM) gezählt wird. Es entspricht ungefähr dem NMM, wobei diesen Zellen auf Grund zunehmender Entartung die Fähigkeit zur Pigmentbildung fehlt. Damit ist eine klinische Diagnose, der bevorzugt an den Extremitäten vorkommenden Tumoren aber auch ihrer Metastasen, schwierig. Letztendlich kann die Diagnose nur eindeutig durch die Histopathologie gestellt werden (Garbe and Leiter, 2009).

1.1.4 Prognose

Die Erstdiagnose maligner Melanome erfolgt derzeit in 90% der Fälle im Primärtumorstadium ohne Metastasierung. Da das Melanom frühzeitig zur Metastasenbildung neigt, hängt eine günstige Prognose sehr stark von einer frühen Diagnosestellung sowie vom Melanom-Subtyp ab. Insgesamt liegt die tumorspezifische 10-Jahres-Überlebensrate bei circa 75-80%, allerdings ist diese stark abhängig von diversen prognostischen Faktoren und je nach Tumorstadium sehr unterschiedlich. Die Einteilung der Tumorstadien erfolgt nach der vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2001 vorgeschlagenen TNM Klassifikation, die mittlerweile durch die Union internationale contre le cancer (UICC) akzeptiert wurde (Balch et al. 2000, Balch et al. 2001a).

Zu den wichtigsten Einteilungskriterien und damit prognostischen Faktoren beim primären malignen Melanom zählen die vertikale Tumordicke nach Breslow (berücksichtigt die Tumordicke) am histologischen Präparat, das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration, der Invasionslevel nach Clark (beschreibt die Eindringtiefe), der Nachweis von Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten durch Sentinellymphknotenbiopsie, das Geschlecht und die Lokalisation des Tumors (Garbe et al., 1995a; Garbe et al., 1995b; Balch et al.,

2001b; Garbe et al., 2002). So liegt beispielsweise die 10-Jahres-Überlebensrate bei einem Tumor ohne Ulzeration mit einer vertikalen Dicke von weniger als 1 mm bei 88-95%, bei einer Tumordicke von mehr als 4 mm dagegen schon nur noch bei circa 53%. In frühen Stadien des Primärtumors gelingt meist noch eine kurative Behandlung durch chirurgische Resektion des Melanoms. Durch Aufklärung der Bevölkerung über die Notwendigkeit eines regelmäßigen Hautscreenings und folglich frühzeitiger operativer Therapie gelang es trotz steigender Inzidenzen die Mortalitätsraten des Melanoms nicht weiter zu steigern. In späteren Stadien, mit bereits vorhandenen Metastasen, ist die Chance auf Heilung auf Grund des Mangels an suffizienten Therapien jedoch gering. Die Metastasierung beim malignen Melanom kann sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen erfolgen, wobei der Großteil der Erstmetastasen im regionären Lymphabflussgebiet liegt. Die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Satelliten- (bis 2 cm um den Primärtumor) oder *In-transit*-Metastasen (Metastasen in der Haut bis zur ersten Lymphknotenstation) liegt nur noch bei 30–50% und nimmt bei regionären Lymphknotenmetastasen auf 20-40% ab. Die Prognose beim Vorliegen einer Fernmetastasierung dagegen ist infaust. Abhängig vom Organbefall liegt sie ohne Therapie nur noch bei wenigen Monaten. In Anbetracht der steigenden Zahl an Neuerkrankungen gewinnt damit die Erforschung der molekulargenetischen Mechanismen des Melanoms, als Grundlage zur Entwicklung neuer Therapieansätze, zunehmend an Bedeutung.

1.1.5 Pathogenese des malignen Melanoms

Die Ursachen der Entstehung des malignen Melanoms sind bis dato nicht geklärt. Man geht jedoch von einem komplexen, in mehreren Stufen und damit sequenziell ablaufendem Prozess aus.

Das maligne Melanom entsteht durch Transformation und Proliferation der in der Basalzellschicht der Epidermis lokalisierten Melanozyten. Das Tumorstadium kann biphasisch oder monophasisch erfolgen (de Braud et al., 2003; Miller et al., 2006). Im Falle eines biphasischen Wachstums schließt sich an die horizontale oder radiale initiale Wachstumsphase (RGP, *radial initial growth phase*) die vertikale Wachstumsphase (VGP, *vertical growth phase*) an, in der die Tumorzellen die tiefer liegenden Hautschichten infiltrieren. Das monophasische Wachstum verläuft ausschließlich vertikal. Beim Übergang in die vertikale

Wachstumsphase und dem damit verbundenen Eindringen von Tumorzellen in die Dermis verändern sich ihre Zelladhäsionsmoleküle und sie erlangen die Fähigkeit zur Metastasierung (de Braud et al., 2003; Miller et al., 2006).

Genetische Veränderungen, wie der Verlust von Tumorsuppressorgenen oder Onkogenaktivierungen, werden bereits frühen Stadien der Melanomentwicklung zugeordnet. Dazu zählen neben anderen auch Veränderungen in MAP-Kinase Signalwegen. Onkogen aktiviertes BRAF oder NRAS vermittelt seine Wirkung über diese Signalwege, die wiederum multiple tumorrelevante Prozesse regulieren und Tumorsuppressoren oder Moleküle zur Zellzykluskontrolle beeinflussen (Fecher et al., 2008). Typischerweise finden sich diese Mutationen in gleichem Maße in metastasierenden wie in nicht metastasierenden Melanomen. Dies lässt zunächst vermuten, dass diese genetischen Veränderungen keine Rolle bei der Entwicklung des metastasierenden Phänotyps spielen. Aktivierende Mutationen von BRAF können beispielsweise sowohl in benignen Nävi als auch in Melanomzellen gefunden werden. Während BRAF in Nävi in die Erhaltung der Zellalterung involviert ist, kann die Inaktivierung von onkogenem BRAF in Versuchsanordnungen die Metastasierung von Melanomzellen verhindern (Tuveson et al., 2003; Yazdi et al., 2003, Uribe et al., 2003; Michaloglou et al., 2005; Sala et al., 2008; Liang et al., 2007; Lyons et al., 2001; Haluska et al., 2007).

Onkogene Mutationen scheinen jedoch für eine Transformation vom benignen zum malignen Phänotyp nicht ausreichend zu sein, so dass von einer Kooperation dieser Mutationen mit anderen Veränderungen (epigenetische Veränderungen oder Genexpressionsveränderungen) ausgegangen wird (Melnikova und Bar-Eli, 2008). Dies ermöglicht wahrscheinlich den Übergang von der horizontalen in die vertikale Wachstumsphase und letztendlich die Metastasierung. Tatsächlich unterscheiden sich metastasierte von nicht metastasierten Melanomen durch eine fehlregulierte Expression oder Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren und ihrer Zielgene (Melnikova und Bar-Eli, 2008). Zu den Zielgenen zählen insbesondere Adhäsionsmarker, Enzyme zum Matrixabbau, Motilitätsfaktoren, Zytokine, Überlebens- und Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren (Nyormoi et al., 2003, Leslie et al., 2005, Barsky et al., 1997). So wird beispielsweise der Übergang von der vertikalen zur horizontalen Wachstumsphase von einer gesteigerten Expression oder Funktion einiger Transkriptionsfaktoren begleitet (Poser et al.,

2004). Auch der Übergang in einen metastasierenden Tumor wird durch die veränderte Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren kontrolliert.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Daten veröffentlicht, die belegen, dass microRNAs eine entscheidende Rolle im malignen Melanom spielen und für ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Melanomentstehung und –Progression hilfreich sind. Melanom-assoziierte microRNAs finden sich meist in chromosomalen Regionen, die in Tumoren häufig amplifiziert oder verloren gegangen sind (Kunz, 2013). Zu den Zielgenen dieser microRNAs zählen unter anderem das onkogene NRAS oder im Melanom fehlregulierte Transkriptionsfaktoren (Kunz, 2013).

1.2 ETS Transkriptionsfaktoren

Das v-ets Onkogen wurde ursprünglich als Teil des *gag-myb-ets transforming fusion protein* eines replikations-defizienten Retrovirus, E26, in Vögeln entdeckt. Das v-ets Onkogen transformiert Fibroblasten, Myeloblasten und Erythroblasten *in vitro* und verursacht verschiedene Leukämien *in vivo*. Die Entdeckung von v-ets verwandten Genen etablierte die ETS Familie als eine der größten Transkriptionsfaktorfamilien mit derzeit 28 bekannten Mitgliedern (Hollenhorst et al., 2011).

Allen ETS Genen ist die sogenannte ETS Domäne gemein. Diese 85 Aminosäuren lange Region bildet eine geflügelte *helix-turn-helix* Struktur zur Bindung an DNA und besteht aus drei alpha Helices und einem vier-strängigen beta Faltblatt. Über die ETS Domäne wird die Bindung an DNA vermittelt. Dabei wird eine bestimmte Kernsequenz (GGAA/T) auf der DNA, die sogenannte ETS Bindestelle (EBS, *Ets binding site*) im Zielgen erkannt. Die Erkennung dieser Sequenz durch bestimmte ETS Mitglieder ist unter anderem von dieser Kernsequenz benachbarten Sequenzen abhängig. Manche ETS Proteine binden zudem mit hoher Affinität an die erweiterte Kernsequenz CCGGGAAGT (Wei et al., 2010). Tatsächlich können Zielgene der ETS Transkriptionsfaktoren zwei verschiedene Klassen von ETS Bindestellen enthalten (Hollenhorst et al., 2007; 2009). Zum einen gibt es sogenannte „*redundant*“ Bindestellen, die in den proximalen Promotorabschnitten von *housekeeping* Genen gefunden werden und jedes ETS Protein mit relativ hoher Affinität binden können. Sie umfassen die

erweiterte Kernsequenz CCGGAAGT. Weiterhin gibt es „spezifische“ Bindestellen, die in den *enhancer* Regionen von Genen, die spezifische biologische Funktion von ETS Proteinen vermitteln, liegen. Diese spezifischen Bindestellen umfassen häufig das Kernmotif AGGAA, liegen zudem meist in Nachbarschaft zu anderen Transkriptionsfaktorbindestellen und binden ETS Faktoren mit niedriger Affinität. Im Allgemeinen ist die DNA Bindung von ETS Proteinen meist Ergebnis einer synergistischen Interaktion mit Transkriptionsfaktorpartnern an zusammengesetzten DNA Elementen.

Ein weiteres Motiv, das viele ETS Mitgliedern neben der ETS Domäne enthalten, ist die *pointed* Domäne (PNT, *pointed domain*). Diese Region formt eine eigene Struktur und spielt eine Rolle bei Protein-Protein Interaktionen oder der Oligomerisierung.

ETS Faktoren können die Expression von Genen sowohl positiv als auch negativ regulieren. Sie sind in die Regulation zahlreicher biologischer Prozesse darunter auch der Proliferation, Differenzierung, Hämatopoese, Apoptose, Metastasierung, dem Geweberemodeling, der Angiogenese und der Transformation eingebunden.

1.2.1 Modulation der ETS Funktion

ETS Proteine wirken häufig nicht als alleinige Regulatoren eines Gens, sondern interagieren auch mit anderen Proteinen wie Transkriptionsfaktoren. Dies führt zu einer sehr gewebe- oder entwicklungsabhängigen Regulation von Zielgenen. Wie bereits erwähnt, führt die Bindung eines ETS Proteins nahe anderer Transkriptionsfaktoren zu einer höher affinen Interaktion und einer synergistischen Aktivierung oder Unterdrückung spezifischer Zielgene. Zudem wird die Aktivität der ETS Mitglieder durch verschiedene ETS-assoziierte Proteine (EAPs, *Ets-associated proteins*) beeinflusst. Diese können beispielsweise die DNA Bindung blockieren oder die synergistische Interaktion mit Kofaktoren unterbinden (Li et al., 2000; Pei et al., 2003).

Viele ETS Proteine sind Endeffektoren zahlreicher Signalwege. Phosphorylierung kann die DNA Bindung, Protein-Protein Interaktionen und ihre subzelluläre Lokalisation beeinflussen. Diese Art der Modulation wird vor allem durch die MAP Kinasen ERK, JNK und p38 vermittelt. Während ERKs durch Zellteilungssignale aktiviert werden, werden JNK und p38 als Antwort auf zelluläre Stresssignale aktiviert. Bestimmte ETS Faktoren sind Substrate eines oder mehrere dieser

Signalwege. So führt beispielsweise die Phosphorylierung von ELK1 an seiner carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne zu einer Zunahme der DNA Bindung und gesteigerten Aktivierung der Transkription. Die Phosphorylierung einer MAP Kinase Phosphorylierungsstelle neben der *pointed* Domäne in ETS1 und ETS2 führt zu deren Aktivierung und damit zu einer positiven Beeinflussung der Transkription ihrer Zielgene.

Auch die subzelluläre Lokalisation kann durch Phosphorylierung verändert werden. So wird beispielsweise die subzelluläre Lokalisation und Funktion von ERF durch den MAP Kinase Signalweg kontrolliert. In Anwesenheit von Zellteilungssignalen wird ERF phosphoryliert und vom Zellkern ins Zytoplasma exportiert. Fehlen Wachstumssignale, wird ERF rasch dephosphoryliert und zurück in den Zellkern transportiert (Hsu et al., 2004).

Neben den MAP Kinase vermittelten Effekten können ETS Faktoren als Antwort auf einen Calciumfluss durch Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Protein Kinasen moduliert werden. Beispielsweise werden sechs Serin Reste neben der ETS Domäne von ETS1 durch CaMKII phosphoryliert. Die Folge ist eine reduzierte DNA Bindungsaktivität von ETS1, zum Teil auf Grund der Stabilisierung einer autoinhibitorischen Domäne.

Eine weitere Möglichkeit der Modulation von ETS Proteinen besteht in der Acetylierung. So wird ETS1 zum Beispiel als Antwort auf den TGF β Signalweg acetyliert. Dies führt zu einer Dissoziation von ETS1 aus einem Proteinkomplex (Czuwara-Ladykowska et al., 2002).

Insgesamt handelt es sich bei den unterschiedlichen Modulationsmöglichkeiten der ETS Faktoren um Zelltyp-spezifische Prozesse.

1.2.2 ETS Faktoren und Tumorerkrankungen

Gemeinsamkeit vieler Tumoren ist die Erlangung neuer funktioneller Kapazitäten, die folgendes ermöglichen: Unabhängigkeit von Zellteilungs- und Zellwachstumssignalen, Verlust der Sensitivität gegenüber Wachstumsbremsenden Signalen, Apoptoseresistenz, Verlust der Zellalterung mit unbegrenzter Zellproliferation, Angiogenese, invasives Wachstum und Metastasierung (Hanahan and Weinberg, 2000). Insbesondere die letzten beiden Punkte sind charakteristisch für viele aggressive und tödlich verlaufende Tumorerkrankungen wie beispielsweise das maligne Melanom. Diese Vorgänge

erfordern einen Kontaktverlust der Zellen zu ihren Nachbarzellen, so dass sie mobil sind und in umliegendes Gewebe eindringen können, um dort weiter zu wachsen. Während abnormales Wachstum und abnormale Differenzierung zur initialen Entwicklung von Tumoren beitragen, müssen Zellen eine ganze Reihe von molekularen Veränderungen durchmachen, bevor sie die Fähigkeit zur Migration und damit den Übergang zu einem aggressiven Tumor erreichen.

Eine Beteiligung von ETS Genen an diesen Vorgängen wurde erstmals durch die Entdeckung der ETS Sequenz im onkogenen E26 Virus festgestellt. Die onkogene Aktivierung von Genen kann auf unterschiedliche Weisen erfolgen. Dazu zählen die Amplifikation oder Überexpression, eine Genaktivierung durch retrovirale Insertion neuer regulatorischer Elemente, die Fusion mit anderen Proteinen als Folge chromosomaler Translokationen oder Punktmutationen. Die Tatsache, dass menschliche ETS Gene in der Region von Translokationsbruchstellen angesiedelt sind und Deletionen oder abweichende Expressionsmustern sich in soliden Tumoren und Leukämien häufen, unterstreicht ihrer Bedeutung im Rahmen der Karzinogenese (Seth and Watson, 2005). So finden sich beispielsweise Amplifikationen von ETS1 in Leukämien und Lymphomen. Weiterhin konnte eine gesteigerte Expression von ETS1 in vielen invasiven und metastasierenden Tumoren nachgewiesen werden. Auf Grund ihrer chromosomalen Lokalisation sind abweichende Expressionsmuster von ETS Faktoren besonders häufig mit der Entstehung von Fusionsproteinen als Resultat von Translokationen assoziiert. Als Beispiele wären hier neben anderen das EWS-Flil Fusionsprotein im Ewing Sarkom oder die translokationsbedingten Fusionen von TEL mit verschiedenen Proteinen in diversen Leukämien zu nennen. Punktmutationen innerhalb von PU.1 dagegen finden sich beispielsweise bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Mueller et al., 2002).

Weitere Tumorentitäten, in denen ETS Faktoren eine Rolle spielen, sind Schilddrüsenkarzinome, Colon-, Leber- und Pankreastumore, Prostatakarzinome sowie Lungen- und Brustkrebs. Dazu zählt auch das maligne Melanom, in dem eine Beteiligung von ETS1 an der Entstehung und Progression nachgewiesen werden konnte (Rothhammer et al., 2004).

Eine entscheidende Funktion im Rahmen der Tumorprogression kommt den ETS Faktoren durch die Beteiligung an der Interaktion zwischen Epithel- und Stromazellen zu. Zielgene der ETS Transkriptionsfaktoren, wie die MMPs (Matrix

Metalloproteinasen) oder andere Proteasen lösen die Proteinkomponenten der extrazellulären Matrix, ein Vorgang der für die Entstehung von Metastasen entscheidend ist.

Ein weiterer wichtiger Schritt der Tumorprogression ist die Angiogenese, die Entstehung neuer Blutgefäße, die ein weiteres Wachstum und die Metastasierung invasiver Tumoren ermöglicht. Sowohl bei physiologischen Gefäßwachstumsprozessen wie der Wundheilung sowie bei der pathologischen Neuentstehung von Gefäßen im Rahmen von Tumorerkrankungen konnte eine entscheidende Beteiligung von ETS Proteinen nachgewiesen werden.

Eine weitere wichtige Funktion nehmen die ETS Faktoren mit der Kontrolle des lymphatischen Systems sowie der Hämatopoese ein. Viele ETS Faktoren spielen hierbei eine entscheidende Rolle, indem sie die Expression von Zelloberflächenrezeptoren myeloischer und lymphatischer Zellen kontrollieren. ERG gilt beispielsweise als ein kritischer Regulator der Aufrechterhaltung fetaler hämatopoetischer Stammzellen und wird somit für die Erhaltung der definitiven Hämatopoese in Mäusen benötigt (Taoudi et al., 2011). Dies erklärt, warum viele hämatopoetische Erkrankungen mit Abweichungen von ETS Faktoren assoziiert sind.

Damit ist klar, dass die Identifizierung von ETS Zielgenen dazu beiträgt Mechanismen, die zur Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen führen, aufzuklären.

1.3 *Dual-specificity* Protein Phosphatasen (DUSPs)

DUSPs (*dual-specificity protein phosphatases*), auch MKPs (MAP Kinase Phosphatasen), gehören zu einer Familie von *dual-specificity* Phosphatasen und dephosphorylieren Threonin und Tyrosin Reste innerhalb der Aktivierungsdomäne von MAP Kinasen (MAPKs) (Kondoh, 2006). Durch die Dephosphorylierung von Threonin- und/ oder Tyrosin Resten werden aktivierte MAPKs inaktiviert. Damit sind MKPs wichtige Regulatoren der Dauer und der Intensität der Aktivität von MAP Kinasen (Ebisuya et al., 2005; Murphy et al., 2006; Pouyssegur et al., 2003). DUSPs haben im Wesentlichen zwei Domänen gemein: die *dual-specificity* Phosphatase Domäne (*dual-specificity phosphatase domain*, DSP) im C-Terminus und die MAPK-bindende Domäne (*MAPK-binding domain*, MKB) im N-Terminus.

Letztere beinhaltet ein konserviertes Cluster basischer, hydrophober Aminosäurereste, die an der Erkennung von MAPKs beteiligt sind und als Kinase-Interaktions Motiv (*kinase interaction motif*, KIM) bezeichnet werden (Kondoh and Nishida, 2007; Owens und Keyse, 2007). Weiterhin enthält diese Region Sequenzen, die die subzelluläre Lokalisation dieser Enzyme bestimmen (Kondoh and Nishida, 2007; Owens und Keyse, 2007). Die C-terminale DSP Domäne ist homolog zum Prototyp der *dual-specificity* Proteinphosphatasen VH-1 im Vaccinia Virus. Die DSP Domänen aller DUSPs zeigen eine große Sequenzhomologie untereinander. Der N-terminalen MKB Domäne mit ihrem Kinase-Interaktions Motiv kommt damit eine entscheidende Rolle in der Festlegung der Substratspezifität der DUSPs zu.

Es konnte gezeigt werden, dass einige MKPs durch die Bindung ihres Substrates an ihre MKB Domäne katalytisch aktiviert werden (Camps et al., 1998; Chen et al., 2001; Dowd et al., 1998; Hutter et al., 2000; Zhang et al., 2005). Die Bindung einer phosphorylierten MAP Kinase an die MKB Domäne der DUSPs führt zu Konformationsänderungen der DSP Domäne und damit zu einer gesteigerten katalytischen Aktivität des Enzyms (Abbildung 1.3).

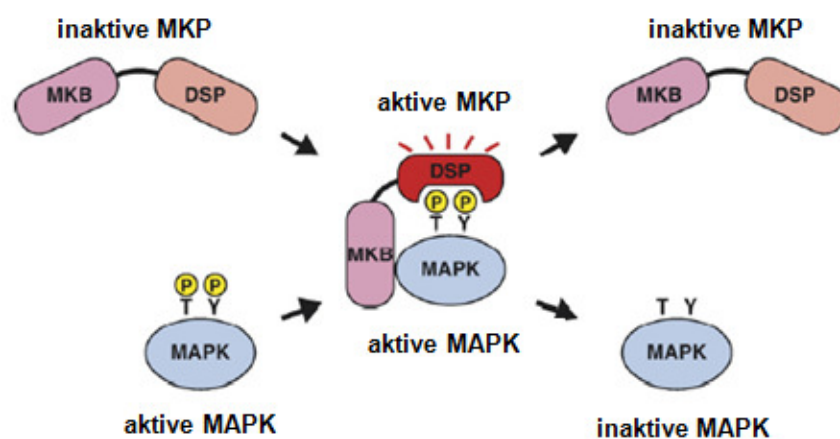


Abbildung 1.3: MKPs binden an aktive MAPKs und inaktivieren diese. Die Bindung führt zu Konformationsänderungen der aktiven MKPs und einer Steigerung ihrer katalytischen Aktivität (modifiziert nach Kondoh and Nishida, 2007).

1.3.1 Klassifizierung der DUSPs

DUSPs unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität innerhalb der MAPK Mitglieder, ihrem Vorkommen in unterschiedlichen Geweben, ihrer subzellulären Lokalisation und ihrer Induktion durch extrazelluläre Stimuli. Gegenwärtig sind

insgesamt 25 DUSPs bekannt. Gemeinsamkeiten in den Sequenzen, in der Proteinstruktur, in der Substratspezifität und in der subzellulären Lokalisation ermöglichen die Einteilung der DUSP Enzymfamilie in drei Gruppen:

Die erste Gruppe wird durch die nukleär induzierbaren Phosphatasen gebildet und umfasst unter anderem die Mitglieder DUSP1, DUSP2, DUSP4 und DUSP5. All diese Enzyme sind Kernproteine und zeigen, mit Ausnahme von DUSP5, eine breite Substratspezifität. Das heißt, dass sie die MAP Kinasen ERK, JNK und p38 inaktivieren können. DUSP5 hingegen ist auf die MAP Kinasen ERK1/2 festgelegt. Die Mitglieder dieser Gruppe sind durch stark induzierbare Gene kodiert und werden durch Zellteilungs- und Stress-Stimuli auf RNA Ebene hochreguliert. Sie bestehen aus 300 bis 400 Aminosäuren und beinhalten eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS) in ihrem N-Terminus (Wu et al., 2005).

Die zweite Gruppe besteht aus den zytoplasmatisch lokalisierten DUSPs. Diese beinhaltet beispielsweise DUSP6, DUSP7 und DUSP9. Die Zytoplasma-ständigen Enzyme zeigen eine hohe Spezifität für ERK und haben sogenannte Zellkernexport-Signale (*nuclear export signals*, NES). Die Verteilung der Mitglieder dieser Gruppe ist auf bestimmte Gewebe begrenzt.

Die dritte Gruppe wird aus den sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisierten Enzymen gebildet. Dazu zählen unter anderem DUSP8, DUSP10 und DUSP16. Sie dephosphorylieren bevorzugt die stressaktivierten MAPKs p38 und JNK und zeigen gegenüber ERK nur eine sehr geringe Aktivität. Zudem haben sie eine erweiterte Region in ihrem N- (DUSP10) oder C-Terminus (DUSP16) neben der MKB – und DSP Domäne. Während die Funktion dieses Bereichs in DUSP10 nicht geklärt ist, beinhaltet diese Region in DUSP16 neben einem NLS und einem NES die sogenannte PEST Sequenz (Polypeptidsequenz reich an **P**rolin, Glutaminsäure (**E**), **S**erin und **T**hreonin; PEST). Letztere findet sich vor allem in rasch abbaubaren Proteinen (Rechsteiner and Rogers, 1996). Die Entfernung der PEST Sequenz führt zu einer Stabilisierung dieser Proteine, so dass diese Region vermutlich eine Rolle beim raschen Umsatz von Proteinen spielt (Matsuguchi et al., 2001).

Neben diesen drei Gruppen gibt es noch sogenannte atypische DUSPs. Diese beinhalten einzig die katalytische Domäne während die Substraterkennungs- oder

Bindungssequenz fehlen. Dazu zählen zum Beispiel DUSP14, DUSP22 und DUSP26.

1.3.2 MAP Kinasen Signalwege und die Rolle der DUSPs

Die Moleküle der MAP Kinasen Signalwege bestehen aus einer hoch konservierten Kinasefamilie, die Informationen von extrazellulären Signalen über diverse Rezeptoren an intrazelluläre Effektoren, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse regulieren, vermitteln. Dazu zählen insbesondere tumorrelevante Prozesse, wie die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Migration und Apoptose (Chang et al., 2001; Davis, 2000; Johnson et al., 2002; Pearson et al., 2001; Wada et al., 2004). MAP Kinasen werden durch Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosin Resten im „TXY“ Motiv innerhalb ihrer Kinase Domäne aktiviert. Dies wird durch *dual-specificity* MAPK Kinasen (MKK oder MEK) vermittelt, die wiederum durch die Phosphorylierung von Serin/ Threonin Resten durch MAPK Kinase Kinasen (MKKK oder MEKK) reguliert werden. Diese dynamische drei-stufige Kaskade führt zur Translokation aktivierter MAP Kinasen in den Zellkern, wodurch unter anderem *immediate early* Gene und Transkriptionsfaktoren(z. B. ETS Faktoren) im Rahmen oben genannter Prozesse aktiviert werden.

Insgesamt können vier Hauptgruppen von MAP Kinasen unterschieden werden.

Die erste Gruppe umfasst die MAP Kinasen ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK). Dieser Signalweg wird mit der Fähigkeit der Tumorzellen, unabhängig von Proliferationssignalen zu wachsen, assoziiert und ist in circa 30% der menschlichen Tumorerkrankungen dereguliert (Keyse, 2008). Viele onkogene Veränderungen, wie beispielsweise eine Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen oder aktivierende Mutationen der Ras GTPase, findet man in den der ERK MAP Kinase vorgeschalteten Komponenten. So zeigen 50-70% der Melanome *missense* Mutationen von BRAF (Davies et al., 2002) und 15% der Melanome weisen Mutationen von NRAS auf (Van't Veer et al., 1989, Albino et al., 1989).

Die zweite Gruppe beinhaltet die Stress-aktivierten c-Jun aminoterminalen Kinasen JNK 1, 2 und 3. Zur dritten Gruppe werden die vier p38 MAP Kinasen (α , β , γ und δ) gezählt. Die MAP Kinasen ERK 3-5, ERK 7 und 8 bilden schließlich die vierte Gruppe.

DUSPs wiederum dephosphorylieren spezifisch die Threonin und Tyrosin Reste der MAP Kinasen und inaktivieren sie dadurch entweder im Zellkern oder im Zytoplasma (Kondoh, 2006). Um ihre Funktion zu kontrollieren, assistieren DUSPs zudem beim Verankern von MAP Kinasen. Über die Regulation von Dauer und Ausmaß der Aktivierung von MAP Kinasen Aktiv nehmen DUSPs somit Einfluss auf die Kontrolle zahlreicher zellulärer Prozesse, die eng mit der Entstehung von Tumorerkrankungen verbunden sind.

1.3.3 DUSPs und Tumorerkrankungen

Im Laufe der Jahre nahm die Zahl der Daten, die Abweichungen in der Expression von DUSPs in Bezug zu Tumorerkrankungen setzten, enorm zu. Dies lässt nicht nur vermuten, dass DUSPs eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren spielen sondern auch, dass diese Enzyme als Tumorregulatoren abhängig von der Tumorentität und dem Progressionsstadium fungieren können. Variationen in ihrer Expression können viele Ursachen haben. Dazu zählt unter anderem der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH).

In vielen Tumoren wird beispielsweise DUSP1 überexprimiert, wobei diese gesteigerte Expression häufig nur für bestimmte Tumorstadien spezifisch ist. So wird DUSP1 in epithelialen Tumoren wie dem Prostata-, Kolon- und Blasenkarzinom während der frühen Tumorphasen überexprimiert und nimmt während der Tumorprogression schrittweise ab. Des weiteren wird die DUSP1 Expression unter anderem durch Hypoxie, einem Kennzeichen vieler aggressiver und therapieresistenter Tumoren, hochreguliert. Es wurde außerdem beschrieben, dass DUSP1 auch in invasiven Tumorstadien, zum Beispiel im Ovarialkarzinom, überexprimiert werden kann. Weiterhin gelang es zu zeigen, dass DUSP1 die Resistenz gegenüber gewissen Chemotherapeutika in bestimmten Tumorentitäten durch Inhibierung von JNK verstärkt (Cortes-Sempere et al., 2009; Sanchez-Perez et al., 2000; Small et al., 2007; Wang et al., 2003; Wang et al., 2008). Somit eignet sich DUSP1, wenn es überexprimiert ist als ein potentiell Target zur Verbesserung der Tumorbehandlung und zur Behandlung von Medikamentenresistenzen. Allerdings werden auch Fälle beschrieben in denen DUSP1 eine gegensätzliche Rolle im Rahmen der Tumorprogression spielen

könnte. So sind beispielsweise die DUSP1 Level im hepatozellulären Karzinom eher erniedrigt als erhöht (Tsujita et al., 2005).

Die potentielle Rolle von DUSP2 in Tumoren ist ebenfalls abhängig vom zellulären Kontext. Ein Verlust der DUSP2 Expression korreliert in akuter myeloischer Leukämie mit einer hohen ERK Aktivität (Kim et al., 1999) während dagegen hohe Werte im Ovarialkarzinom mit einer geringen Überlebenszeit assoziiert sind (Givant-Horwitz et al., 2004).

Die zu den nukleär induzierbaren MKPs zählende Phosphatase DUSP4 wird unter anderem in frühen Stadien von Ovarialkarzinomen, in Pankreaskarzinomen, Hepatomen und Mammakarzinomen überexprimiert. Reduzierte Expressionswerte von DUSP4 finden sich dagegen in Lungentumoren mit EGFR Mutationen (Chitale et al., 2009).

Das DUSP6 Gen ist in einer chromosomalen Region angesiedelt, die mit dem Verlust der Heterozygotie im Pankreaskarzinom assoziiert ist. In dieser Tumorart ist DUSP6 als Folge einer Hypermethylierung des Promotors häufig herunter reguliert (Xu et al., 2005). Die Reinduktion von DUSP6 führt hier zu einem Abfall der ERK Aktivität, einer Suppression des Zellwachstums und einer gesteigerten Apoptose. Wie schon für DUSP1 in anderen Malignomen, geht DUSP6 mit zunehmender Tumorprogression im Pankreaskarzinom verloren. Zudem gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen KRAS Mutationen und der Expression von DUSP6. Eine verringerte Expression von DUSP6 konnte weiterhin in Lungentumoren beobachtet werden. Dort führte eine Reexpression zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums (Okudela et al., 2009). Neben Melanomzelllinien, die Mutationen in BRAF oder NRAS aufwiesen konnte eine Überexpression von DUSP6 in Brustkrebszellen, chronischer myeloischer Leukämie und Gliomen nachgewiesen werden. All diese Tumorerkrankungen zeigen eine Überaktivierung der MEK/ERK Signalkaskade und legen einen Zusammenhang mit der Überexpression von DUSP6 nahe. Zudem konnte für DUSP6 wie für DUSP1 eine Beteiligung an der Resistenz gegenüber Therapeutika gezeigt werden.

Für DUSP9 wiederum wird eine Rolle als Tumorsuppressor diskutiert. Tatsächlich nehmen die Expressionswerte von DUSP9 in Tumorzellen ab. Eine Reexpression von DUSP9 durch subkutane Injektion in Mäusen führte zum Zelltod und der Unterdrückung der Tumorbildung (Liu et al., 2007). Trotzdem konnte eine

Überexpression von DUSP9 in akuten Leukämien (Levy-Nissenbaum et al., 2003a und 2003b) nachgewiesen werden.

Insgesamt unterstreichen diese Daten den Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression von DUSPs und der Entstehung von Tumoren: Gleichzeitig wird aber deutlich, dass diese, je nach Kontext sowohl Tumorfördernd als auch als Tumorsuppressoren wirken können.

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, circa 21 Nukleotide lange, hoch konservierte, nicht kodierende RNAs, die im Genom fast aller Eukaryoten, über Pflanzen bis zu den Säugetieren zu finden sind. Sie spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Genregulation, insbesondere beim *gen-silencing*, der aktiven Abschaltung von Genen. Dies wird hoch spezifisch auf post-transkriptionaler Ebene vermittelt. Abweichungen in ihrer Expression werden in pathologischen Veränderungen, darunter auch Tumorerkrankungen beobachtet. MicroRNAs können circa 30% der Protein-kodierenden Gene in Säugetieren regulieren (Lewis et al., 2005). Somit ist es nicht verwunderlich, dass sie in die Regulation vieler tumorrelevanter Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und die Kontrolle des Zell-Zyklus eingebunden sind.

1.4.1 Biogenese von microRNAs

MicroRNAs werden aus Vorläufermolekülen, den sogenannten *pri-miRNAs*, gebildet (Abbildung 1.4.1). Diese Vorläufermoleküle entstehen entweder durch Transkription von unabhängigen microRNA-Genen oder sind nach Transkription durch die RNA Polymerase II Teil eines Introns von Protein-kodierenden Genen. Pri-miRNAs beinhalten oft die Sequenzen mehrerer verschiedener microRNAs und falten sich in Haarnadelstrukturen. Die weitere Prozessierung der pri-miRNAs erfolgt in zwei Schritten durch die RNase III Endonucleasen Drosha und Dicer. Beide Enzyme liegen in Komplexen mit Proteinen, die Bindestellen für doppelsträngige RNA enthalten, vor. In einem ersten Schritt wird aus der noch im Kern lokalisierten pri-miRNA durch das RNase III Enzym Drosha zusammen mit seinem Cofaktor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) eine circa 60

– 110 Nukleotide lange Haarnadelstruktur herausgeschnitten, die sogenannte *pre-miRNA*, die die reife microRNA enthält (Bushati et al., 2007; Rana 2007; Du und Zamore, 2005, Peters und Meister, 2007). Die *pre-miRNA* wird nun mittels Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert, wo in einem zweiten Schritt das Enzym Dicer zusammen mit seinem Cofaktor TRBP (*TAR RNA binding protein*) die *pre-miRNA* zu einer circa 20 Nukleotide langen *microRNA Duplex* weiterverarbeitet. Während ein Strang des *microRNA Duplex* abgebaut wird, bleibt der zweite als reife *microRNA* erhalten. Im Anschluss an die Prozessierung ordnen sich *microRNAs* in einem als *miRISC* (*miRNA-induced silencing complex*) oder auch als *miRNP* (*micro-ribonucleoprotein*) bezeichneten Multienzymkomplex an, der unter anderem Proteine der Argonaute Familie beinhaltet (Filipowicz et al., 2008). Die Anordnung in diesem Komplex ist ein dynamischer Prozess, der in der Regel an die Verarbeitung der *pre-miRNA* durch das Enzym Dicer gekoppelt ist (Bushati et al., 2007; Rana 2007; Du und Zamore, 2005, Peters und Meister, 2007).

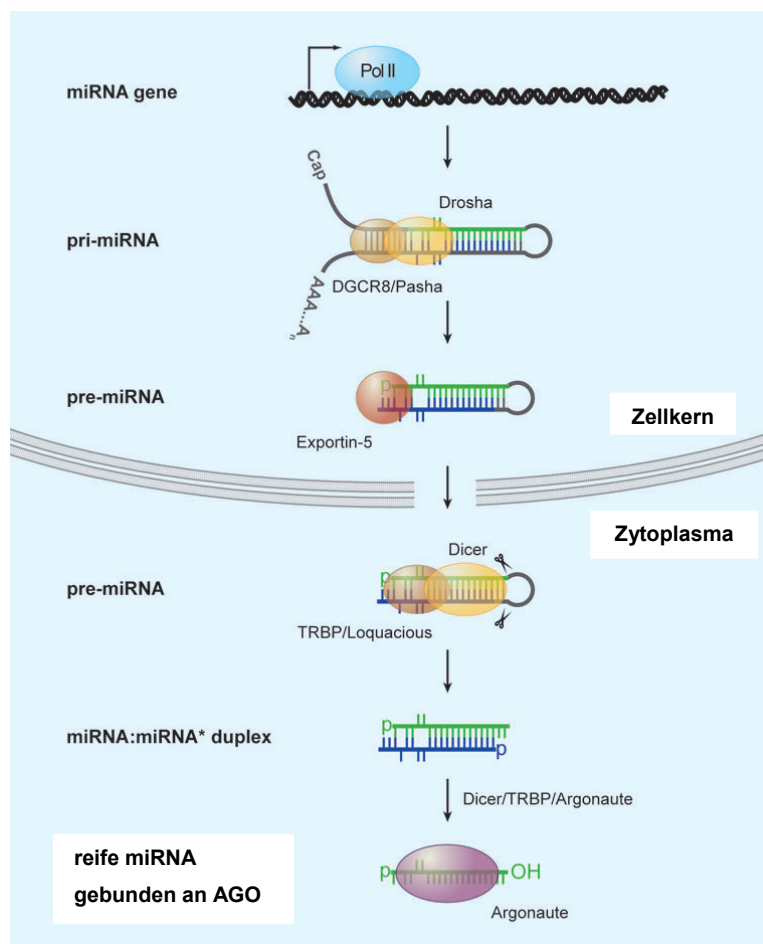


Abbildung 1.4.1: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese (modifiziert nach Bushati et al., 2007)

1.4.2 Interaktion zwischen microRNA und Ziel-mRNA

Die Genregulation durch miRNAs erfolgt durch Interaktion mit ihrer Ziel-mRNA über Basenpaarung. Dabei binden miRNAs in Pflanzen mit perfekter oder nahezu perfekter Komplementarität die Zielsequenz der mRNA, wodurch es zu einem RNAi-ähnlichem Abbau der Ziel-mRNA durch endonukleolytische Spaltung kommt (Jones-Rhoades et al., 2006). Die Zielsequenzen liegen dabei meist in der proteinkodierenden Region der mRNA. Dieser Mechanismus unterscheidet sich deutlich von dem in Metazoen. Mit wenigen Ausnahmen binden die miRNAs hier mit nur imperfekter Komplementarität an ihre in der 3'-untranslatierten Region liegenden mRNA Zielsequenzen (Doench und Sharp, 2004; Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005; Grimson et al., 2007; Nielsen et al., 2007). Die drei wesentlichen Regeln, die dieser imperfekten Basenpaarung zu Grunde liegen, konnten durch experimentelle und bioinformatische Ansätze bisher nur unvollständig geklärt werden.

Erforderlich für die miRNA-mRNA Interaktion ist zum einen eine perfekte Basenpaarung der miRNA Nukleotide 2 bis 8, der sogenannten *seed* Region mit der Zielsequenz in der 3'-untranslatierten Region der Ziel mRNA. Diese Interaktion bildet den Kern der miRNA-mRNA Assoziation. Guanin-Urazil (GU) Paarungen, *mismatches* (nicht komplementäre Basenpaarung) sowie die Bildung von Blasen (*bulges*) innerhalb der *seed* Region stören die RNA-Interaktion. Dagegen wirken sich Adenosin in Position 1 und Adenosin oder Uracil in Position 9 der Ziel mRNA, obwohl diese Nukleotide nicht zwingend komplementär zur miRNA sein müssen, positiv auf die Effizienz der Bindung aus.

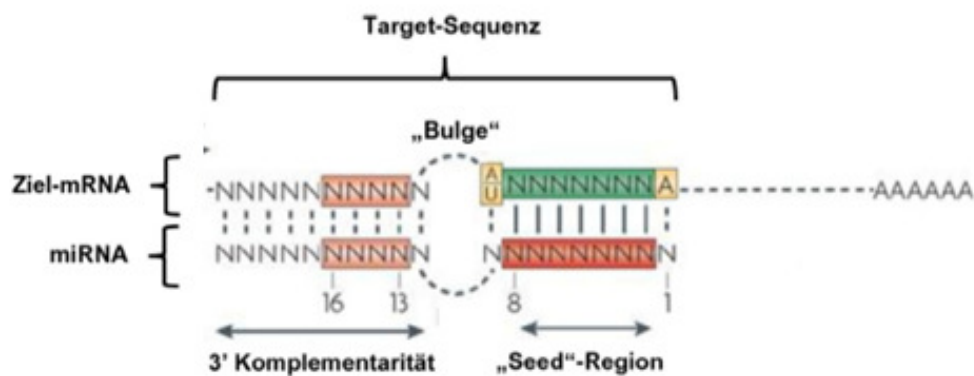


Abbildung 1.4.2: Schema der miRNA Bindung an die Ziel-mRNA (modifiziert nach Filipowicz et al., 2008)

Weiterhin sind nicht komplementäre Basenpaarungen, sogenannte *mismatches* oder die Bildung von *bulges* innerhalb des miRNA-RNA-Doppelstranges erforderlich, vermutlich um die AGO vermittelte Spaltung der mRNA zu ermöglichen.

Dritte Voraussetzung ist das Vorhandensein einer ausreichenden Komplementarität der Zielsequenz der mRNA zur 3'Hälfte der miRNA, um die Bindung zu stabilisieren. Dabei können *missmatches* und Blasen prinzipiell in dieser Region toleriert werden. Eine stabile Basenpaarung vor allem innerhalb der Nukleotide 13 bis 16 der miRNA dagegen ist besonders wichtig, wenn die Komplementarität innerhalb der *seed* Region nur eingeschränkt gegeben ist (Brennecke et al., 2005; Grimson et al., 2007) (Abbildung 1.4.2).

Nach der Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA wird die weitere Prozessierung der mRNA zu einem funktionellen Protein unterbunden. Dabei kann zum einen die Ziel-mRNA nach Entfernung des Poly-A Schwanzes am 3'-Terminus (Deadenylierung) und anschließender Entfernung der 7-Methylguanosin Kappe am 5'-Terminus (Decapping) exonukleolytisch abgebaut werden. Zum anderen kann die Translation auf Ebene der Initiation oder der Elongation inhibiert werden. Der Mechanismus der Degradation der Ziel-mRNA ist jedoch der häufigere Weg zur Inhibierung der Proteinexpression (Guo et al., 2010).

1.4.3 MicroRNAs im malignen Melanom

In den vergangenen Jahren wurden viele genetische Veränderungen identifiziert, die die Entstehung des malignen Melanoms beeinflussen. Die Entdeckung von microRNAs eröffnete neue Möglichkeiten der epigenetischen Genregulation, der auch im Rahmen der Melanomentstehung durch Regulation von Tumorsuppressorgen und Onkogenen eine zentrale Rolle zukommt. In kombinierten Studien gelang die Identifizierung diverser im malignen Melanom fehlregulierter miRNAs, deren Rolle und Funktion für die Entstehung des Melanoms durch Erforschung ihrer Zielstrukturen und Regulationsmechanismen weiter untersucht wurde (Bonazzi et al., 2012).

So konnten in unserer Arbeitsgruppe zahlreiche miRNAs, die entweder mit der Entstehung oder mit der Progression des Melanoms assoziiert sind, identifiziert werden. Des Weiteren wurden 11 miRNAs beschrieben, die in Primärtumorzellen und Metastasen unterschiedlich exprimiert werden (Mueller et al., 2009). Weiterhin

gelang Boyle et al. anhand vier signifikant unterschiedlich exprimierter miRNAs zwischen benignen Melanozyten und Melanomzellen zu unterscheiden.

Da viele Tumorsuppressoren und Onkogene im Melanom einer epigenetischen Regulation unterliegen, wurden gleiche Regulationsmechanismen für miRNAs, die an der Progression des malignen Melanoms beteiligt sind, vermutet. Mazar et al. gelang es, 15 miRNAs zu identifizieren, die durch Promotormethylierung im Melanom inhibiert werden.

Neben der Identifizierung bereits bekannter miRNAs in benignen Melanozyten, Nävuszellen oder diverse Melanomzellen wurden im Laufe der Zeit zahlreiche neue miRNAs entdeckt. Von einigen dieser neuen miRNAs wird vermutet, dass sie spezifisch in melanozytären Zellen exprimiert werden.

Hinsichtlich ihrer Funktion bezüglich Tumorentstehung unterscheidet man TSG miRNAs (Tumorsuppressorgen miRNAs) und oncomiRNAs (Onkogen miRNAs). Tumorsuppressorgen miRNAs sind in Malignomen in der Regel herunterreguliert, ihre Zielgene, in diesem Fall Onkogene, werden dadurch hochreguliert. Die Überexpression einer Tumorsuppressorgen miRNA ist ausreichend zur Umkehrung eines malignen Phänotypes in seine benigne Form. Ziel der Onkogen miRNAs dagegen sind die Tumorsuppressorgene. Eine gesteigerte Expression von Onkogen miRNAs führt zu einer Umkehrung des benignen in den malignen Phänotyp.

Ein verlängertes Zellüberleben durch Inhibition der Apoptose sowie die erhöhte zelluläre Migration ermöglichen im malignen Melanom die Zellinvasion sowie die Absiedlung von Metastasen. Eine Fehlregulierung dieser drei Hauptwege, der Invasion, der Proliferation und der Apoptose sind somit entscheidend für die Tumorprogression. Neben der Identifizierung relevanter miRNAs galt es nunmehr, ihre Funktion im Rahmen der Melanomentstehung durch die Identifizierung von Zielgenen und ihrer Beteiligung an einem dieser Wege genauer zu untersuchen.

So zählt zum Beispiel die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte miRNA196a unter anderem zu den Tumorsuppressor miRNAs, die im malignen Melanom geringer exprimiert werden und denen eine Beteiligung an der Zellinvasion zugeschrieben wird (Braig et al., 2010; Mueller und Bosserhoff, 2011). Unter den miRNAs, die im Melanom erhöht (oncomiRNAs) und an der Zellinvasion sowie der Metastasierung beteiligt sind, findet sich beispielsweise miRNA30b/30d (Gaziel-Sovran et al., 2011).

Weiterhin gelang es, zahlreiche miRNAs zu identifizieren, die über die Regulation ihrer Zielgene einen Einfluss auf Zellproliferation und Zellüberleben im malignen Melanom haben.

Es gibt jedoch auch miRNAs, welche nicht eindeutig den TSG miRNAs oder den oncomiRNAs zugeordnet werden können. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation von MITF (*microphthalmia transcription factor*) durch miRNAs, dem zentralen Regulator der Melanogenese. Auf Grund seiner kontext-abhängigen und teilweise gegensätzlichen Funktion im Melanom können die regulierenden miRNAs nicht als TSG- oder oncomiRNAs klassifiziert werden.

Die steigende Anzahl an Daten, die spezifische miRNAs mit der Tumorprogression im malignen Melanom verbinden, trägt dazu bei, miRNAs als starke diagnostische und prognostische Marker zu etablieren und ihren Einsatz als Therapeutika zu ermöglichen. Erste Erfahrungen diesbezüglich gibt es bereits. So konnte gezeigt werden, dass miRNA29c als Marker für ein verbessertes krankheitsfreies Überleben verwendet werden kann (Nguyen et al., 2011). Zudem kann die miRNA221 durch qRT-PCR in Patientenserum gemessen und als Tumormarker eingesetzt werden (Kanamaru et al., 2011). Die miRNA221 Werte in Melanompatienten lagen signifikant über den in Gesunden und korrelierten mit der Tumordicke (Kanamaru et al., 2011). Nach chirurgischer Resektion des Melanoms fielen die miRNA 221 Werte und stiegen bei einem Rezidiv wieder an (Kanamaru et al., 2011).

Diese Daten zeigen die Relevanz der miRNAs als prognostische Marker und als potentielle Ziele für verbesserte Therapien.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst der Transkriptionsfaktor ERG auf eine Fehlregulation im malignen Melanom untersucht werden. Weiterhin galt es ein Zielgen von ERG zu identifizieren. Dazu sollte die Expression der beiden Varianten des potentiellen Zielgens *DUSP4* in diversen Melanomzelllinien untersucht werden. In einem dritten Schritt sollte letztendlich ein Regulator von *ERG* gefunden werden. Dabei sollten die Auswirkungen einer Überexpression der miRNA196a2 auf die Expression von *ERG* und *DUSP4* untersucht werden. Ziel war es letztendlich, durch die Identifizierung eines dem Transkriptionsfaktor ERG

vor- und eines dem Transkriptionsfaktor ERG nachgeschalteten Element einen im malignen Melanom veränderten Regulationspfad aufzudecken.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Materialien

Adobe Systems, San Jose, USA

Ambion, Austin, USA

AppliChem, Darmstadt

BD Discovery Labware Falcon™,
Bosten, USA

Behrens, Hamburg

BioRad, Richmond, USA

BioWhittaker Molecular Applications,
Rockland, USA

Cell Signaling Technology® Inc.,
Danvers, USA

DAKO, Glostrup, Dänemark
Fremontas, Burlington, Canada

GraphPad Prism Software Inc.,
San Diego, USA

GE Healthcare Life Sciences,
Buckinghamshire, GB

Invitrogen, Karlsruhe

Adobe Photoshop CS2 Software

**mirVana™ qRT-PCR miRNA
Detection Kit**, **mirVana™ qRT-PCR
Primer Sets**, **mirVana™ qRT-PCR
Primer Sets for Normalisation (U6)**

Acrylamid-Lösung (40%)

Einmalartikel für Zellkultur, 15 ml
und 50 ml **Polystyrene Round-
Bottom Tubes**, **Lab-Teks für
Immunfluoreszenz**

Agar

Sequi-Blot PVDF Membrane

SeaKem LE Agarose

**Anti-mouse IgG HRP-linked
Antibody**

FITC-Anti-Rabbit Antikörper
**Page Ruler™ Prestained Protein
Ladder**

GraphPad Prism 4.0 Software

**Amersham ECL Western blotting
detection reagents and analysis
system**

Lipofectamin PLUS™ Reagent,
Lipofectamin™ Reagent,
**SuperScript™ II Reverse
Transcriptase Kit**, **Ready-Load™**

	100 bp DNA Ladder, SeeBlue®
	Plus2 8Protein Standart, pcDNA3
	Vektor
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsenzyme, NEB Puffer für
	Restriktionsenzyme
Nunc, Wiesbaden	96-Well Platten für BCA
	Messungen
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
PAN Biotech GmbH, Aidenbach	Dulbeccos Modified Eagle Medium
	(DMEM), Fötales Kälberserum
	(FKS), PBS (phosphate buffered
	saline), Penicillin/ Streptomycin,
	Trypsin
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi and Maxi
	Kit
Riedel de Haen, Seelze	Ethanol, Methanol
Roche Diagnostics, Mannheim	Taq®-DNA Polymerase, RNase A,
	Light Cyclers Kapillaren,
	Ethidiumbromid, dN6 Primer
Roth, Karlsruhe	Roti® Load 4x
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Erg-1/2/3 Antikörper, MKP-2
	Antikörper
Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	Oligonukleotide für qRT-PCR,
München	Monoclonal Anti-DUSP4 Antikörper
Sigma, St. Louis, USA	Ampicillin, BSA, Ethidiumbromid,
	Monoclonal Anti-β-Actin Antibody,
	SDS, TEMED, Tween® 20
Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli® XL2-Blue
	MRF'Ultra-competent Cells
TaKaRa, Shiga, Japan	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect
	Real Time)
Vector Laboratories, Burlingame, USA	VectaShield Mounting Medium
Whatman International Ltd,	Whatman Chromatography Paper
Maidstone, England	(3MM)

Zymed Laboratories Inc, San Francisco, USA BCIP/NBT Substrate Kit

2.1.2 Geräte

Blottapparaturen

Whatman Biometra, Göttingen

Minigel Twin, Fastblot B34

Brutschränke

Heraeus, Hanau

Zellinkubator CO₂- Auto- Zero

Gelelektrophoreseapparaturen

BioRad, München

Wide Mini Sub[®] Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436, Thermomixer
comfort, Thermomixer compact

Mikroskope

Leitz, Wetzlar

Zeiss, Jena

Labovert FS, Aristoplan,
Axiovert 10ICM 405, Axioplan
Epifluorescence Mikroskop

Spannungsgeräte

Amersham Pharmacia Biotech,

Little Chalfont, England

BioRad, München

Electrophoresis Power Supply
1001,

Electrophoresis Power Supply 301

Modell 200/2.0 power supply,
Consort E455

Sterilwerkbänke

Heraeus, Hanau

LaminAir[®] HBB 2472 S,

Lamin Air[®] HBB 2448

Thermocycler

MJ Research, Waltham, USA

Roche Diagnostics, Mannheim

Peltier Thermal Cycler PTC- 200

LightCycler[®] II

Waagen

Sartorius, Göttingen

R160P, L2200S

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5415C, MiniSpin Plus

Hereaeus, Hanau

Biofuge 13, Biofuge 22R,

Megafuge 1.0

Kisker, Steinfurt

Tischzentrifuge

Roche Diagnostics, Mannheim

LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

Bachofer, Reutlingen

UV-Transilluminator IL 350 K,
254 nm

Bühler, Edmund, Tübingen

Schüttler SM 25

Eastman Kodak, Rochester, USA

Entwicklermaschine X-Omat 2000
Processor

Heidolph, Kehlheim

Magnetrührer MR 2000, MR 2002,
Vortexer REAX 2000

IKA-Labortechnik, Staufen

Schüttler IKA-Vibrax VXR

MWG Biotech, Ebersberg

ELISA-Reader Emax

Peqlab, Erlangen

Nanodrop Photometer

Tuttnauer/Systec, Wetzlar

Autoklav 2540 EK

WTW, Weilheim

pH-Meter pH522

2.1.3 Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL2-Blue MRF' ultrakompetente Escherichia Coli Zellen
(Stratagene. Heidelberg).

2.1.4 Säugetierzelllinien

501 Mel Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase

A375 Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase

HMB2 Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase

HTZ 19d Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms

Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase, stabil
miRNA196a2	transfiziert mit dem miRNA Expressionskonstrukt pcDNA3_miR 196a2 (Klon 4 - 6); hergestellt von Dr. Simone Braig und Dr. Daniel Müller
Mel Im pcDNA3	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase, stabil transfiziert mit dem pcDNA3 Leervektor (Klon 8, Klon 12); hergestellt von Dr. Simone Braig und Dr. Daniel Müller
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Juso	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Melanozyten (NHEM)	<i>Normal Human Epidermal Melanocytes</i>
Sk Mel28	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Sk Mel3	Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms

2.1.5 Vektoren

pcDNA3

Der pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) ermöglicht unter Verwendung des CMV Promotors eine hohe, konstitutive Expression einklonierter Gensequenzen in einer Vielzahl von Säugetierzelllinien.

miRNA Expressionskonstrukt pcDNA3_miR 196a2

Das Expressionskonstrukt zur Überexpression von miRNA196a2 wurde von Dr. Daniel Müller erstellt. Dazu wurden die pre-miR kondierenden Bereiche aus genomischer DNA von Melanozyten mittels PCR amplifiziert und in einen PCR II Topovektor ligiert. Aus diesem wurden sie mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI ausgeschnitten und in den pcDNA3 Vektor eingebracht.

2.1.6 Oligonukleotide

Primer für Expressionsanalysen

β-Aktin forward	5'-CTA-CGT-GGC-CCT-GGA-CTT-CGA-G-3'
β-Aktin reverse	5'-GAT-GGA-GCC-GCC-GAT-CCA-CAC-GG-3'
ERG forward	5'-AGT-TTC-CCT-GGG-CAT-CTT-TT-3'
ERG reverse	5'-TAA-TCC-AAA-TGA-CAC-GGG-GT-3'
DUSP4 var1 forward	5'-CGG-GAG-ATG-GAC-TGC-AGT-GT-3'
DUSP4 var1 reverse	5'-CAG-GAT-CTG-CTC-CAG-GCT-CA-3'
DUSP4 var2 forward	5'-AGT-TCA-CTC-CAA-CGG-AAG-CCA-GTT-T-3'
DUSP4 var2 reverse	5'-GAG-CTG-CAG-CCC-AGG-TCC-AAG-G-3'

Primer für miRNA Expressionsanalysen

miRNA196a RT	5'-CGC-GCC-TGC-AGG-TCG-ACA-ATT-AAC-CCT- CAC-TAA-AGG-GCC-CCA-ACA-ACA-TG -3'
miRNA196a PCR	5'-GTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GGG-AGA-AGA- GTA-GGT-AGT-TTC-3

Die Sequenzen der U6-RT- und U6-PCR Primer sind von der Firma Ambion (Austin, USA) nicht freigegeben.

2.1.7 Medien, Antibiotika, Puffer und Lösungen

Medien zur Anzucht von *E.coli* und Säugetierzellkulturen

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl für Platten: + 15 g/l Agar zur Selektion: + 100 µg/l Ampicillin
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach) Zusätze: 10 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) Penicillin/ Streptomycin

Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml in ddH ₂ O (-20°) (500x)
-------------------------------	--

Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E. coli* (HiSpeed™ Plasmid Midi und Maxi Kit der Firma Qiagen)

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris Cl, pH 8,0
--	-----------------------

	10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 nM NaOH 1 % SDS (w/v)
Puffer P3 (Natralisationspuffer)	3.0 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT (Equilibrationspuffer)	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol (v/v) 0,15 % Triton [®] X-100 (v/v)
Puffer QC (Waschpuffer)	1.0 m NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol (v/v)
Puffer QF	1.25 M NaCl 50 mM Tris Cl, pH 8,5 15 % Isopropanol (v/v)
Puffer TE	10 mM Tris Cl, pH 8,0 1 mM EDTA
Lösungen für die Agarose Gelelektrophorese	
TAE (50x)	2 M Tris/ Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1,5 % (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	40 % (v/v) Saccharose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung	0,04% (w/v) in ddH ₂ O

Lösungen zur Isolation von Gesamtproteinen

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1% (w/v) Nonidet® P40 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1% (w/v) SDS
--------------------	--

Lösungen und Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Page-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
10%-Trenngel	25% (v/v) Bis-Acrylamid (40%) 37,5% (v/v) 1 M Tris pH 8,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED
4%-Sammelgel	10% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 12% (v/v) 1 M Tris pH 6,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED

Lösungen für den Western Blot

Western Blot-Transferpuffer	10% (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin
Western Blot Semi-Dry-Transferpuffer	3 g/l Tris Base 11,3 g/l Cilcinc 100 ml/l Methanol

PBS (10x)	80 g/l NaCl
------------------	-------------

2,0 g/l KCl
14,4 g/l Na₂HPO₄
2,4 g/l KH₂PO₄
mit HCl auf pH 7,4 einstellen

TBST (10x)

100 mM Tris-Cl
1,5 M NaCl
mit HCl auf pH 7,5 einstellen
0,0001 % Tween® 20 (v/v)

Blockierungslösungen

3 % BSA in PBS (w/v),
4 % Magermilchpulver (w/v)

Sonstige Puffer und Lösungen

PBS (für Zellkultur, Immunfluoreszenz) PAN Biotech GmbH (Aidenbach)

RNAse A Lösung

10 mM Tris/HCl pH 7,0
10 mg/ml RNAse A

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Amplifizierung des pcDNA3_miRNA196a2 Expressionskonstrukts wurden *E. coli* in flüssiger Schüttelkultur oder auf festen Nährböden kultiviert. Das Plasmid trug eine Resistenz gegen Ampicillin, die zur Selektion der transformierten Bakterien verwendet wurde. Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt, auf Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank, die der flüssigen Kulturen im Schüttelinkubator bei 37°C und 250 U/min.

2.2.1.2 Transformation

Zur Transformation kompetenter *E. coli* wurden 50 ng Plasmid-DNA zu 50 µl kompetenten Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen einem 45 sekündigem Hitzeschock (42°C) zur Plasmidaufnahme ins Zellinnere ausgesetzt. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien eine Minute auf Eis abgekühlt. Es wurden pro Ansatz 500 µl LB Medium zugegeben und die Kultur wuchs 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln (800 U/min) an. Die transformierten *E. coli* wurden dann 5 Minuten bei 8000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibendem Medium resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zur Selektion auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid DNA (Midi-Präparation)

Die Isolierung von miRNA196a2-Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit dem Hispeed Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen nach beiliegender Anleitung. Das Plasmid wurde wie folgt präpariert. 4 ml steriles LB Medium mit 8 µl Ampicillin (Selektionsantibiotikum) wurden mit einer Einzelkultur der transformierten *E. coli* angeimpft und 5 Stunden bei 37°C auf dem Bakterienschüttler angezogen. Anschließend wurde der Ansatz in 50 ml LB

Medium mit 100 µl Ampicillin überführt und weitere 16 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen der Schüttelkultur durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000 U/min und 4°C pelletiert und in 6 ml Pufferlösung P1 (siehe 2.1.7) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz mit 6 ml Pufferlösung P2 versetzt und zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt. Dies ermöglichte auch die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA: Proteine wurden durch das in Lösung P2 enthaltene SDS, chromosomale DNA (nicht jedoch superhelikale Plasmid-DNA) durch das alkalische Milieu (NaOH) denaturiert. Der Abbau von RNA erfolgte durch die in Lösung P1 enthaltenen RNase A. Zum Abstoppen der Reaktion wurden nach 5 Minuten 6 ml der Pufferlösung P3 zugegeben und der Ansatz nach vorsichtigem Durchmischen in einen speziellen Filter, der in eine Spritze integriert ist, überführt. Dieser zehnmünütige Schritt führt durch das in Lösung P3 enthaltene Kaliumacetat zur Neutralisation sowie einer verbesserten Ausfällung der unerwünschten Bakterienzellbestandteile (chromosomale DNA, Protein, Zelldebris) und des SDS. In der Zwischenzeit wurde der Hi Speed Midi Tip durch Waschen mit 4 ml QBT Pufferlösung vorbereitet und anschließend das Zelllysate aus der Filterspritze in das Hi Speed Midi Tip zur Entfernung von RNA- und Proteinresten und der Lösung unspezifischer Bindungen gepresst. Hierbei wird das SDS vollständig entfernt. Bei der Filtration des geklärten Lysates durch das Hi Speed Midi Tip wurde die Plasmid DNA gebunden, während zelluläre Bestandteile in der filtrierten Lösung verblieben. Das Hi Speed Midi Tip wird anschließend mit 20 ml QC Pufferlösung gewaschen. Um die Plasmid-DNA aus dem Tip zu eluieren werden 5ml QF Pufferlösung in das Hi Speed Midi Tip gefüllt und das Filtrat aufgefangen. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wird der Ansatz in einer 20 ml Spritze über den aufgesteckten QIAprecipitator gepresst und somit filtriert. Im darauffolgenden Waschschrift wurden 2 ml 70%iges Ethanol über die Filtermembran des QIAprecipitators gepresst. Um die Membran zu trocknen und den Alkohol zu entfernen, wurde zwei Mal mit der Spritze Luft durch den QIAprecipitator gepresst. Die Ausfällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 1 ml TRIS-Pufferlösung. Um im Filter verbliebene Reste zu lösen und somit die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde das Eluat ein zweites Mal über den QIAprecipitator filtriert.

Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert und zur Transfektion von Melanomzelllinien verwendet (siehe 2.2.5.2.)

2.2.2 RNA-Techniken

2.2.2.1 Isolation von RNA aus Säugerzelllinien

Die Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit dem RNeasy Protect Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Zellen abgenommen und die Zellen zwei Mal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 700 µl PBS von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgeschabt und bei 8000 U/min für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 350 µl RNA Lysispuffer (pro 1 ml TRK Puffer werden 20 µl Mercaptoethanol zugesetzt) des RNeasy Kits resuspendiert und lysiert. Da sich die Zellen sehr leicht lysieren lassen, ist kein weiterer Schritt zum Zellaufschluss nötig. Zu dem Lysat werden 350 µl Ethanol (70%) gegeben und der Ansatz durch Vortexen gut durchmischt. Anschließend wurde das Lysat in eine MicroElute RNA Säule gegeben und die RNA durch Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10 000 x g an diese gebunden. Über die MicroElute RNA Säule wurde zunächst 500 µl RWF Puffer und in den folgenden beiden Schritten jeweils 500 µl RNA Wash Buffer II für 30 Sekunden bei 10 000 x g filtriert. Um die in der MicroElute Säule gebundene RNA zu trocknen, schloss sich eine zweiminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit an. Die RNA wurde durch Zugabe von 15 µl H₂O unter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute in ein Eppendorf Cup eluiert. Abschließend wurde die extrahierte RNA zur Konzentrationsbestimmung am Nanodrop vermessen und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte mit dem Nanodrop der Firma Peqlab sowie der zugehörigen Software. Nach Auswahl des Programms *Nucleic Acids* wurde zunächst entionisiertes Wasser als Blindprobe vermessen und anschließend die Einstellung *RNA-40* ausgewählt. Nach Auftragen von 1 µl Probe auf den Sensor des Gerätes wurde die Messung über die Anweisung *Measure* gestartet. Der Sensor wurde vor jedem Messdurchgang mit einem Papiertuch gereinigt. Die Ergebnisse wurden in ng/µl angegeben.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Für das Umschreiben von mRNA in cDNA wurden pro Reaktionsansatz 500 ng aus Zelllinien eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt:

- 4 µl First Strand buffer (5x)
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl dN₆ Primer (random 2mg/ ml)
- 11 µl RNA und H₂O

Zur Denaturierung der RNA wurde der Ansatz 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlung auf 50°C fügt man zur Transkription 1 µl Superscript II (Invitrogen) hinzu. Die Umschreibereaktion erfolgt bei 37°C für 60 Minuten. Danach folgt eine zehnminütige Inkubation bei 70°C zum Abstoppen der Reaktion durch Denaturierung des Enzyms. Abschließend erfolgt durch Zugabe von 1 µl RNase A Mix der RNase Verdau für 30 Minuten bei 37°C.

Die Reverse Transkription von miRNAs erfolgte mit dem mirVana qRT-PCR miRNA Detection Kit der Firma Ambion (Austin, USA) sowie miRNA spezifischen RT-Primern (siehe 2.1.6.). In getrennten Ansätzen wurde für jede miRNA196a2 Probe eine zweite RT Reaktion mit dem für das Normalisierungsmolekül U6 snRNA spezifischen RT-Primer durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 50 ng RNA in 1 µl Nuklease-freiem H₂O eingesetzt. Für beide RT-Primer wurde außerdem ein Leeransatz mit 1 µl Nuklease-freiem H₂O erstellt, der nach der Transkription im Light Cycler als Negativkontrolle verwendet wurde. Die Reaktion wurde in einem 10 µl Ansatz durchgeführt und folgendem Programm am Thermo-Cycler unterzogen:

- 5,6 µl Nuklease-freies H₂O
- 2 µl mirVana 5x RT Buffer
- 1 µl 1x mirVana RT-Primer (miRNA196a/ U6 snRNA)
- 0,4 µl Array Script Enzyme Mix
- 1 µl RNA/ Nuklease-freies H₂O

30 min bei 37°C Reverse Transkription

10 min bei 95°C	Inaktivierung des Array Script
4°C	Endtemperatur

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3 DNA-Techniken

2.2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerase Kettenreaktion genutzt. Diese Methode diente nicht der Ermittlung von Ergebnissen sondern vielmehr der Qualitätsprüfung der aus Zellkulturversuchen gewonnen cDNA. Dazu wurde das Haushaltsgen β -Aktin amplifiziert.

Die Reaktion erfolgte unter Verwendung folgenden 50 μ l Reaktionsansatzes:

1 μ l	cDNA Template
0,5 μ l	Primer forward (20 mM)
0,5 μ l	Primer reverse (20 mM)
5 μ l	10x PCR Puffer
0,5 μ l	dNTP
42 μ l	H ₂ O steril
0,5 μ l	Taq Polymerase

Die Reaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (2 Minuten bei 94°C) wurde zur Amplifikation von β -Aktin folgendes Standardprogramm verwendet:

Denaturierung	30 Sekunden bei 94°C
Annealing und Amplifikation	2 Minuten bei 68°C
finale Amplifikation	5 Minuten bei 68°C

Die Amplifikation erfolgte über 28 Zyklen. Im Anschluss an die PCR wurden die Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt.

2.2.3.2 Quantitative Echtzeit PCR

Die Quantifizierung der Expressionstärke von mRNA wurde in einer quantitativen RT-PCR Reaktion, mit Hilfe des Light Cycler II Systemes von Roche, durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem in 2.2.2.3. beschriebenen Protokoll.

Das Light Cycler System ermöglicht eine quantitative und qualitative Analyse der PCR Produkte. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessung in der exponentiellen Phase der PCR. Der Farbstoff SYBR Green erzeugt bei Einlagerung in doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzsignal, dessen Zunahme mit der Zunahme der *target*-DNA korreliert. Zur Identifizierung des spezifischen Produktes dient die Schmelzkurvenanalyse. PCR Produkte denaturieren abhängig von der Fragmentlänge bei unterschiedlichen Temperaturen, den spezifischen Schmelztemperaturen.

Als Standard zur Quantifizierung durch relativen Menge-Vergleich wurde das Haushaltsgen β -Aktin verwendet.

Folgender 20 μ l Reaktionsansatz wurde zur Durchführung verwendet:

1 μ l	cDNA Template
10 μ l	SYBR Green
0,5 μ l	Primer forward (20 mM)
0,5 μ l	Primer reverse (20 mM)
8 μ l	H ₂ O steril

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde der Reaktionsansatz nachstehenden Programmen am Light Cycler unterzogen.

	ERG	DUSP4 var1	DUSP4 var2
initiale Denaturierung	30 s bei 95°C	30 s bei 95°C	30 s bei 95°C
Denaturierung	3 s bei 95°C	3 s bei 95°C	3 s bei 95°C
Primer-Annealing	10 s bei 58°C	5 s bei 61°C	10 s bei 58°C
Amplifikation	8 s bei 72°C	16 s bei 72°C	8 s bei 72°C
Zyklen	45	45	45
Messtemperatur	82°C	86°C	86°C

Um die Expressionsstärke der miRNA196a2 zu quantifizieren, wurde das oben genannte Protokoll abgeändert. Im Anschluss an die RT Reaktion des mirVana qRT-PCR miRNA Detection Kits (siehe 2.2.1.3.) wurde die quantitative RT-PCR Reaktion mit folgendem 20 µl Reaktionsansatz durchgeführt:

1 µl cDNA Template aus der miRNA RT-Reaktion
 10 µl SYBR Green
 0,5 µl miRNA spezifische PCR-Primer (bzw. U6 snRNA PCR-Primer)
 8,5 µl H₂O steril

Zur Normalisierung wurde die kleine RNA U6 snRNA eingesetzt. Dabei wurde der Versuchsansatz zur Quantifizierung der miRNA196a2 folgendem Programm am Light Cycler unterzogen:

	miRNA 196a
initiale Denaturierung	30 s bei 95°C
Denaturierung	3 s bei 95°C
Primer-Annealing	5 s bei X°C
Amplifikation	16 s bei 72°C
Zyklen	50
Messtemperatur	X°C

2.2.3.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Im Anschluss an die Isolation des miRNA196a2 Plasmids aus E. coli durch Midi-Präparation (siehe 2.2.1.3.) erfolgte zur Produktkontrolle ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und XhoI (beide in NEB). Folgender 10 µl Reaktionsansatz wurde für 75 Minuten bei 37°C inkubiert:

1 µl Plamid DNA
 1 µl NEB 2 Puffer
 1 µl BSA (10x)
 1 µl BamHI
 1 µl XhoI
 5 µl H₂O steril

Die Spaltprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.3.4.).

2.2.3.4 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarose in TAE). Dabei wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V pro Zentimeter Gellänge. Anschließend wurde das Gel zum Anfärben der DNA für 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) inkubiert und durch UV-Licht visualisiert. Die Größe der Fragmente konnte durch Vergleich mit DNA-Längenstandarts bestimmt werden.

2.2.3.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt dabei näherungsweise folgender Zusammenhang:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \text{ Einheit} = 50 \text{ µg/ml dsDNA}$$

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakt

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus kultivierten Säugerzelllinien wurden die konfluent wachsenden Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und für 5 Minuten bei 8000 U/min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl RIPA Puffer (siehe 2.1.7) resuspendiert und 15 Minuten bei 4°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Das Gesamtprotein wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 13000 U/min bei 4°C von den restlichen Zellbestandteilen getrennt, abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Gesamtproteinextrakt

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in wässrigen Lösungen erfolgte unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kit der Firma Pierce (Pierce/ Peribo Science, Bonn) nach dem Prinzip der Biuret Reaktion. Diese basiert auf der, durch die Peptidbindungen in Proteinen vermittelten alkalischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} , welches mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet. Durch

photometrische Messung bei 562 nm kann die Proteinkonzentration quantifiziert werden, da sie in einem definierten Bereich linear zur Intensität der Färbung und somit zur gemessenen Absorption ist.

Die Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins erfolgte im Doppelansatz in 96-Well Platten. Pro Well wurden 5 µl Proteinlösung mit 200 µl BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) versetzt und bis zur Entwicklung einer violetten Färbung (ca. 20 Minuten) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte in einem ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg). Durch parallele Quantifizierung einer Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung mit bekannter Proteinkonzentration, konnte die enthaltene Proteinmenge bestimmt werden.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht auf Polyacrylamid Gelen. Durch die Anlagerung von negativ-geladenen SDS-Molekülen wird die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen zerstört, zudem werden Ladungsunterschiede neutralisiert. Pro Spur wurden 40 µg Gesamtprotein in 1x Roti-Load Auftragspuffer für 10 Minuten bei 70°C aufgekocht und anschließend bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² auf 10%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

2.2.4.4 Western Blot

Um spezifische Proteine mittels Antikörper zu detektieren, wurden durch SDS-Page (siehe 2.2.3.3) aufgetrennte Proteingemische auf eine PVDF Membran geblottet. Hierzu wurde die PVDF Membran zunächst für 10 Minuten in Methanol hydrophilisiert und anschließend ebenso wie die Polyacrylamidgele (im Anschluss an die Auftrennung) für 15 Minuten in 1x Western Blot Puffer (ERG) bzw. Semi-Dry Transfer Buffer (DUSP4) inkubiert. Entsprechend der Blotrichtung von oben nach unten, wurde die Membran unter das Polyacrylamidgel gelegt, Ober- und Unterseite mit jeweils einem Whatman Papier bedeckt und in die Apparatur (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5 mA/cm²) eingelegt, die mittels elektronischem Transfer die Proteine auf die Membran überträgt. Die PVDF Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierungslösung inkubiert und anschließend mit dem Primär-Antikörper in geeigneter Verdünnung versetzt und bei 4°C geschwenkt.

Detektiertes Protein	ERG	DUSP4
Blockierungslösung:	3% BSA in PBS	4% Milchpulver
Inkubationszeit	1h	über Nacht
primärer Antikörper	ERG (rabbit)	DUSP4 (mouse)
Verdünnung	1:2000 in 3% BSA in PBS	1:500 in 5% BSA in TBST
Inkubationszeit	1h	2h

Nach dreimaligem Waschen (je 5 Minuten bei ERG; je 10 Minuten bei DUSP4) mit dem entsprechenden Puffer (ohne Zusatz) wurde die Membran mit einem, gegen den konstanten Teil des Primär-Antikörper gerichteten (speziesspezifischen) Sekundär-Antikörper (in entsprechendem Puffer ohne Zusatz) bei Raumtemperatur inkubiert (ERG 1 Stunde, DUSP4 2 Stunden).

Zur Detektion der ERG-Proteinbanden wurden Alkalische Phosphatase konjugierte Sekundär-Antikörper verwendet. Nach dreimaligem Waschen (10 Minuten in entsprechendem Puffer) wurde das Substrat für die Alkalische Phosphatase zugegeben (BCIP/ NBT Substrate Kit, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA). Durch Abspalten des Phosphatrestes vom 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat durch die Alkalische Phosphatase kommt es in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid zur Bildung eines violetten bis blauen Farbstoffes. Durch diese Reaktion konnten spezifische Proteinbanden auf der PVDF Membran visualisiert werden.

Die Detektion von DUSP4 erfolgte mit einem HRP (horseradish peroxidase) gekoppelten Sekundär-Antikörper. Nach dreimaligem Waschen (10 Minuten in entsprechendem Puffer) wurde das Substrat für die HRP zugegeben. Die horseradish peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol (bzw. dessen Derivate) in seine oxidierte Form, bei der optische Strahlung entsteht. Die Banden wurden durch Entwicklung im X-Omat 2000 Processor (Eastman Kodak, Rochester, USA) auf Folien sichtbar gemacht.

Zum Vergleich der aufgetragenen Proteinkonzentration der Proben wurde bei jedem Western Blot zusätzlich die Proteinbande des Haushaltsgens β -Aktin, nach der jeweiligen Methode (siehe oben) detektiert.

2.2.4.5 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden pro Feld 30 000 Zellen auf chamber-cover-slides ausgesät. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen nach einmaliger Waschung mit PBS auf dem Objektträger durch Zugabe von 250 µl 4% Paraformaldehyd fixiert und ein zweites Mal mit PBS gewaschen. Um intrazelluläre Proteine anfärben zu können, permeabilisiert man die Zellen im Anschluss mit 0,1% Triton-X-100 für 5 min. Danach werden die Zellen erneut 3 Mal mit PBS gewaschen und die unspezifischen Proteine mit 1% BSA in PBS, eine Stunde, für eine folgende Antikörperreaktion blockiert. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper (ERG 1:300 in 1% BSA in PBS) und drei weitere Waschschriffe mit PBS. Im nächsten Schritt wurde der fluoreszenzmarkierte, FITC (Fluoresceinisothiocyanat) konjugierte Sekundär-Antikörper (Exzitationsmaximum: 495nm, Emissionsmaximum: 528nm) für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Die Kernfärbung erfolgte mit einer Dapi-Lösung, die dem Eindeckelmedium VectaShield bereits zugesetzt war. Dies dient zum „Eindeckeln“ der Objektträger mit Deckgläschen. Der Sekundär-Antikörper, welcher Flourochrom markiert ist, kann im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

2.2.4.6 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Der Nachweis beruht auf der Affinität des Antikörpers zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft, dem Epitop (hier ERG bzw. DUSP4), als Antigen-Antikörperreaktion. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht. Die Anfärbung des gewünschten Antigens erfolgt in einem aufwendigen Mehrschrittverfahren.

Die in dieser Arbeit beurteilten Gewebestanzten wurden im Routinelabor der Pathologie der Universitätsklinik Regensburg mit dem EnVision Detektionssystem (Antikörperkonzentration ERG/ DUSP4 1:50) angefertigt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Zellkulturmethoden

2.2.5.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle verwendeten Melanomzelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und 5 min mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen 4 min bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in neuem DMEM mit FKS resuspendiert und 1:5 oder 1:10 verdünnt auf neue Kulturflaschen verteilt. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag erneuert.

2.2.5.2 Transiente Transfektion von Melanomzelllinien

In dieser Arbeit dargestellte Ergebnisse wurden ausschließlich unter Verwendung stabil transfizierter Melanomzelllinien gewonnen. Die mit dem miRNA196a Vektor stabil transfizierten Zelllinien wurden mir freundlicherweise von Dr. Simone Braig und Dr. Daniel Müller zur Verfügung gestellt. Zum besseren Verständnis wurde von mir exemplarisch eine transiente Transfektion des miRNA196a2 Vektors in Melanomzelllinien durchgeführt.

Dazu wurde die Lipofectamin Methode mit Lipofektamin Reagent und Lipofektamin PLUS Reagent (Invitrogen) verwendet. Es wurden 300 000 Zellen pro Well auf 6-Wellplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte nach Mediumwechsel die Transfektion nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde pro Doppelansatz ein Mastermix aus 5 µl Lipofectamin und 35 µl DMEM sowie ein Probenansatz (Doppelansatz) erstellt. Für den Probenansatz wurde 1 µg Plasmid DNA mit DMEM auf ein Volumen von 34 µl ergänzt und mit 6 µl Lipofectamin versetzt. Beide Ansätze wurden zusammengeführt, 15min inkubiert und nach Mediumwechsel auf die Zellen gegeben (pro Well 40 µl). Das Transfektionsgemisch wurde nach 4 Stunden durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 48 Stunden inkubiert.

2.2.6 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

2.2.6.1 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

Die Berechnung und Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit erfolgte mit den Programmen Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH,

Unterschleißheim), GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA) und Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, San Jose, USA). Bei Genexpressionsstudien (Light Cycler) wurden die Expressiondaten des untersuchten Gens relativ zu einer Kontrolle dargestellt. Diese wurde auf den Wert 1 gesetzt.

2.2.6.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, San Diego, USA). Sämtliche Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen wiederholt. Sämtliche Ergebnisse werden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Zum statistischen Vergleich zwischen den Gruppen wurde der gepaarte t-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Hierbei gilt *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,002$, ****: $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant.

2.2.6.3 Densitrometrische Auswertung

Zur densitrometrischen Vermessung der Western Blot Proteinbanden wurde die Adobe Photoshop CS2 Software (Adobe Systems, San Jose, USA) verwendet. Dabei wurde zunächst das Originalbild „invertiert“. Anschließend wurde mit dem Auswahlrechteck die kleinste Proteinbande möglichst eng umrahmt, so dass nur helle Bereiche erfasst wurden, und der Mittelwert im Histogramm (Anzahl der Pixel) ermittelt. Ohne die Größe des Auswahlrechtecks zu verändern, wurden auf diese Weise auch die übrigen Proteinbanden vermessen. Zum Schluss erfolgte die Vermessung einer beliebigen, homogenen Stelle des Hintergrundes. Es schlossen sich zwei weitere Messdurchgänge mit jeweils unterschiedlich großen Auswahlfeldern an.

Die Berechnung der Bandenintensität unter Abzug des Hintergrundsignals erfolgte nach dem von Rainer Schmid etablierten Protokoll mit der Software Microsoft Office Excel 2003, die graphische Darstellung mit GraphPad Prism 4.0.

3 Ergebnisse

3.1 Expression des Transkriptionsfaktors ERG im malignen Melanom

In den beispielhaft untersuchten Melanomzelllinien zeigte sich im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten sowohl eine Erhöhung als auch eine Reduktion der Expression des Transkriptionsfaktors ERG (Abbildung 3.1.1).

Die Zelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ho und SkMel 28 stammen aus

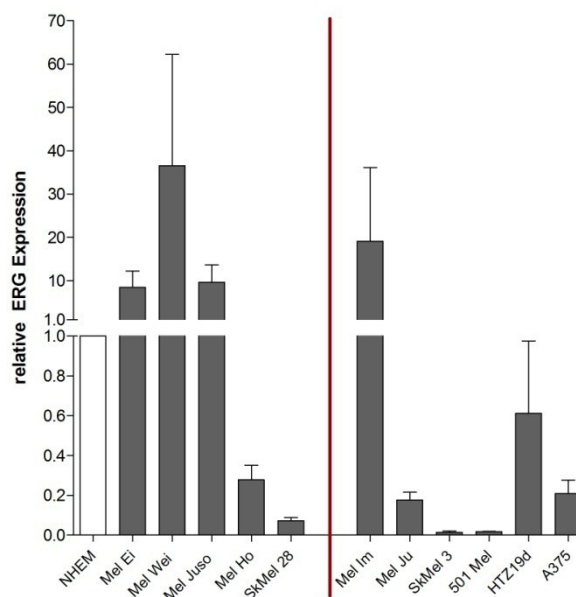


Abbildung 3.1.1: Relative Expression des Transkriptionsfaktors ERG von elf Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen epidermalen Melanozyten (NHEM), die bei der Berechnung auf 1 gesetzt wurden. Die vertikale rote Linie trennt die fünf Primärtumorzelllinien von den 6 Metastasenzelllinien. Der Achsenumbruch markiert die Grenze zwischen reduzierter und erhöhter relativer Expression.

primären Melanomtumorzellen, während die Zelllinien Mel Im, Mel Ju, SkMel 3, 501 Mel, HTZ19d und A375 aus Melanommetastasen generiert wurden. Die in der quantitativen Echtzeit PCR verwendeten Primerpaare detektieren die Transkriptionsvarianten 1 bis 6 des Transkriptionsfaktors ERG.

Dabei zeigten drei der Primärtumorzelllinien sowie die aus einer Melanommetastase gewonnene Zelllinie Mel Im eine bis zu 35-fach erhöhte ERG mRNA Expression im Vergleich zu gesunden Melanozyten. Eine reduzierte ERG mRNA Expression wurde in den primären Zelllinien Mel Ho, SkMel 28 und in den Metastasenzelllinien Mel Ju, SkMel 3, 501 Mel, HTZ19d und A375 ermittelt (Abbildung 3.1.1).

Fasst man die Werte der Melanomzelllinien, die eine gesteigerte Expression zeigen zusammen, so ergab sich durchschnittlich eine mehr als 18-fach erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors ERG im Vergleich zu normalen epidermalen Melanozyten (Abbildung 3.1.2: Gruppe 1). Die gemittelten Werte der Melanomzelllinien mit verminderter *ERG* Expression, zeigten eine mehrfach signifikante Reduktion auf circa ein Fünftel gegenüber gesunden Melanozyten (Abbildung 3.1.2: Gruppe 2).

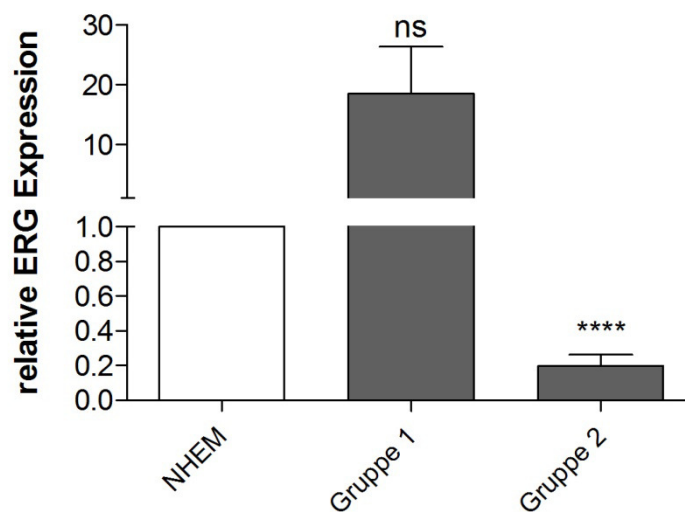
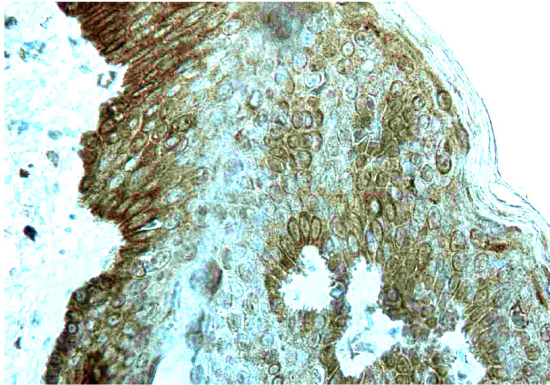


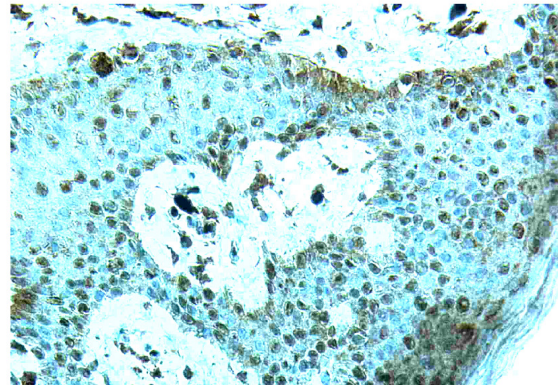
Abbildung 3.1.2: Relative Expression des Transkriptionsfaktors ERG als Mittelwert der Melanomzelllinien mit erhöhter Expression (Gruppe 1) und der Melanomzelllinien mit reduzierter Expression (Gruppe 2) im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM), die bei der Berechnung auf 1 gesetzt wurden. Die Abbildung enthält einen Achsenbruch in der y-Achse bei 1. Die Sterne * kennzeichnen das Signifikanzniveau, ns steht für nicht signifikant.

Weiterhin wurde die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors ERG in Gewebestansen aus gesunder Haut, Nävuszellnävi, Primärmelanomen sowie Melanommetastasen mittels Immunhistochemie untersucht. Als Hauptlokalisationsort der ETS Proteine gilt der Zellkern, wobei durch Phosphorylierung ihre subzelluläre Lokalisation geändert werden kann (Oikawa et al., 2003). Der zur Ermittlung der ERG Proteinexpression verwendete Antikörper detektiert die Protein Isoformen 1 bis 3 des Transkriptionsfaktors ERG. Die exemplarisch dargestellten Präparatausschnitte wurden bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Für alle Schnitte gilt, dass ein Teil des Farbsignals im Zytoplasma der dargestellten Zellen durch das braune Pigment Melanin entsteht und somit als Artefakt zu werten ist. Dies gilt auch für Farbsignale in den oberen Abschnitten gesunder Haut, an die Melanin abgegeben wird.

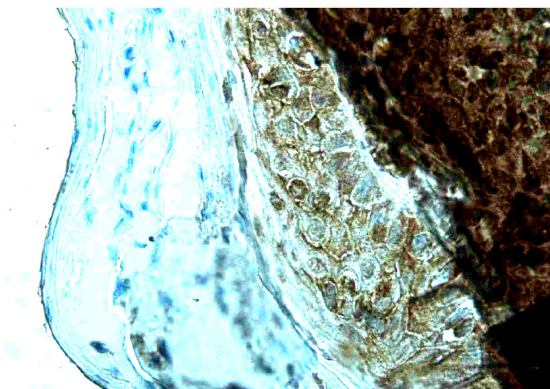
In gesunder Haut zeigte sich in den Melanozyten der Basalzellschicht der Epidermis eine geringe Expression des Transkriptionsfaktors ERG. Dabei stellt sich das Zytoplasma gegenüber dem Zellkern intensiver gefärbt dar (Abbildung 3.1.3: Haut).



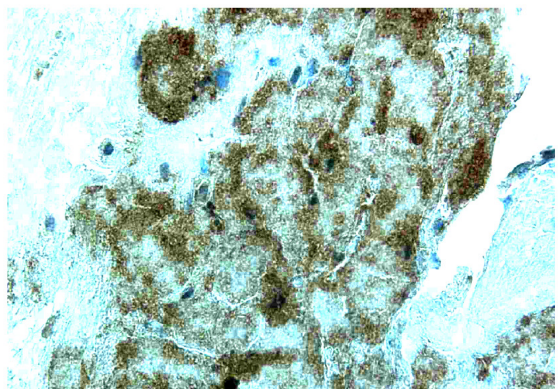
Haut



Nävuszellnävus



Primärtumor



Lungenmetastase

Abbildung 3.1.3: Expression des Transkriptionsfaktors ERG in Gewebestanzungen aus Haut, Nävuszellnävus, Primärtumor eines malignen Melanoms und einer Melanommetastase. Immunhistochemisch mit Anti-ERG1/2/3 Antikörper detektiert.

In Nävuszellen zeigte sich ein deutlich geringeres Färbesignal in den Zellkernen durch den ERG Antikörper und damit eine geringere Expression des Transkriptionsfaktors (Abbildung 3.1.3: Nävuszellnävus). Der Nävuszellnävus ist eine benigne Fehlbildung der Haut, bestehend aus Nävuszellen, die über die Stufe des dysplastischen Nävus zum malignen Melanom entarten kann. Nävuszellen sind den Melanozyten sehr ähnlich, unterscheiden sich aber in ihrer kugelig bis spindeligen Form, der Anordnung in Nestern und dem Fehlen von Dendriten zur Melaninabgabe von diesen (Jung, Moll, 2003).

Ein starkes Farbsignal und somit eine deutlich stärkere Expression von *ERG*, wiesen die Melanomzellen des dargestellten Primärtumors auf. Zudem fällt die

deutlich intensivere Färbung der Zellkerne, gegenüber dem Zytoplasma auf (Abbildung 3.1.3: Primärtumor).

Melanomzellen einer Lungenmetastase zeigten ebenfalls ein deutliches Farbsignal, dass in seiner Intensität für eine gering stärkere *ERG* Expression als in gesunden Melanozyten spricht (Abbildung 3.1.3: Metastase). Auch hier fällt eine stärkere Anfärbung der Zellkerne gegenüber dem Zytoplasma auf.

Insgesamt zeigte sich somit auch auf Protein Ebene in den Gewebestanzungen eine höhere *ERG* Expression in Melanomzellen als in gesunden Melanozyten. Insbesondere die deutlich stärkere Kernfärbung der malignen Zellen signalisiert spezifisch die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors ERG im malignen Melanom. Im Nävuszellnävus lies sich nur wenig ERG detektieren.

Zusammenfassend konnte so eine vermehrte *ERG* Expression auf mRNA Ebene in bestimmten Melanomzelllinien und auf Protein Ebene in Gewebestanzungen aus Primärtumor- und Metastasenzellen gegenüber normalen humanen dermalen Melanozyten gezeigt werden.

3.2 Expression der *dual-specificity* Protein Phosphatase DUSP4 im malignen Melanom

MAP Kinase Phosphatasen wie DUSP4 gelten als negative Regulatoren der mitogen-activated Protein Kinasen (MAPK). ETS Faktoren wie ERG dagegen werden von MAPKs aktiviert. Am *DUSP6* Promotor konnte bereits ein ETS Faktor abhängiger Mechanismus, bei dem Signalgebung durch die MAP Kinase ERK eine Aktivierung der *DUSP6* Transkription bewirkt, aufgezeigt werden (Ekerot et al., 2008). Dies veranlasste uns zu Beginn der Arbeit zu der Annahme, dass ein direkter regulatorischer Zusammenhang zwischen dem ETS Faktor ERG und *DUSP4* bestehen könnte.

Notwendige Voraussetzung für einen direkten ETS Faktor vermittelten Effekt an einem Gen, ist eine ETS Bindestelle in der Promotorregion. Der Einsatz von vergleichenden Genomanalysen, um nicht-kodierende DNA Sequenzen innerhalb der 5'-Regionen in orthologen Genen verschiedener Spezies zu detektieren, ist ein nützliches Werkzeug zur Identifizierung von regulatorischen Elementen (Aparicio et al., 1995).

In der durchgeführten Promotoranalyse von *DUSP4* Genen von Maus, Ratte und Mensch konnte circa 100 Basenpaare vor dem mutmaßlichen Transkriptionsstart der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* eine ETS Bindestelle in direkter Nachbarschaft zu Bindestellen für andere Transkriptionsfaktorfamilien identifiziert werden (Abbildung 3.2.1).

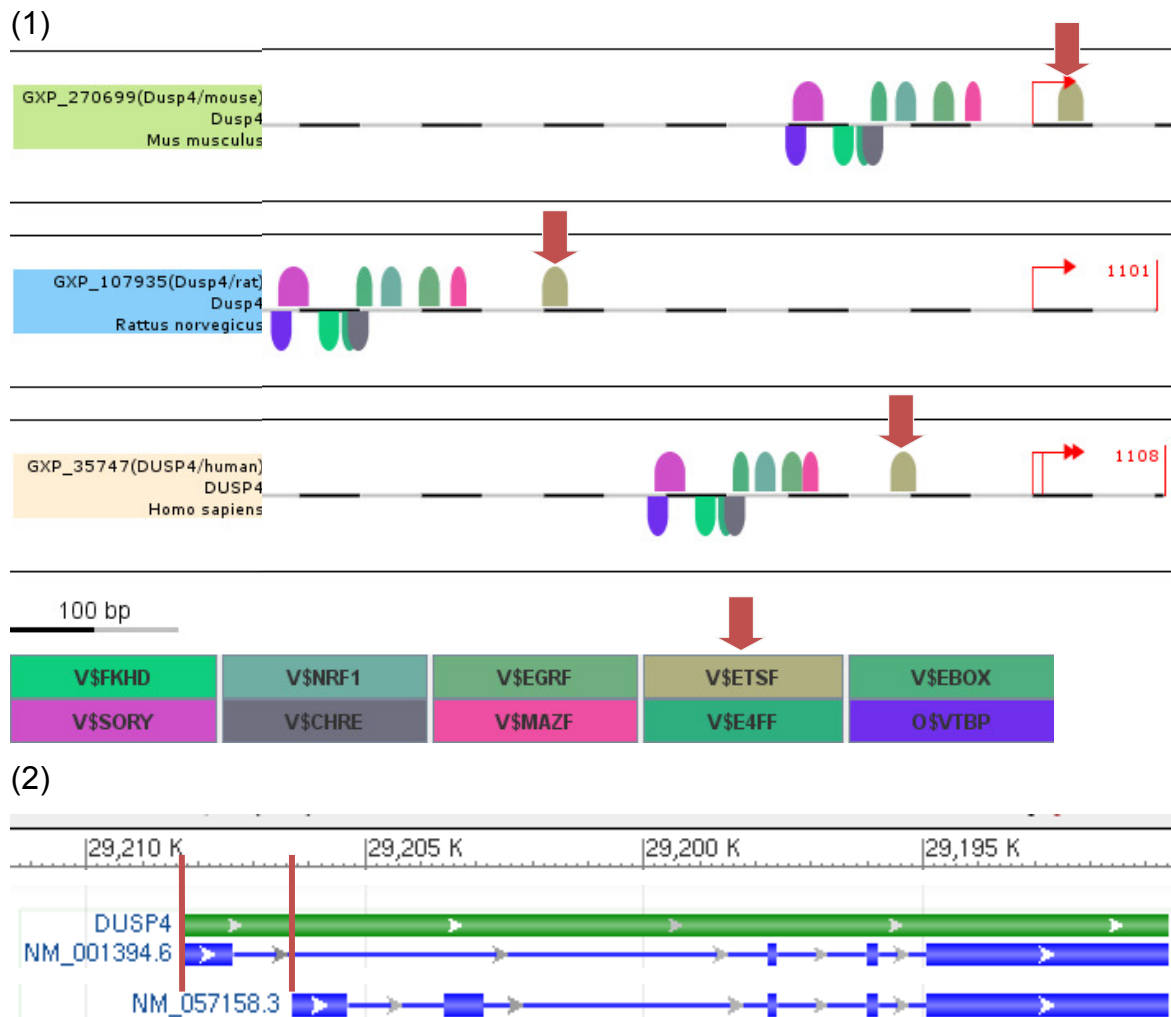


Abbildung 3.2.1: (1) Vergleichende *DUSP4* Promotoranalyse der Spezies Maus, Ratte und Mensch. Die farbigen Halbkreise markieren die Transkriptionsfaktorbindestellen. Der dicke rote Pfeil kennzeichnet die ETS Bindestelle, die dünnen roten Pfeile markieren den Transkriptionsstart. (2) Der grüne Balken entspricht genomischem *DUSP4* auf Chromosom 8. Der obere blaue Balken entspricht der Transkriptionsvariante 1, die circa 2000 Basenpaare (Abschnitt zwischen den vertikalen roten Linien) vor Transkriptionsvariante 2 liegt (modifiziert nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Da mit der Identifikation der ETS Bindestelle im *DUSP4* Promotor die notwendige Voraussetzung für eine direkte Modulation durch ERG geschaffen war, wurde nun,

um vergleichende Aussagen treffen zu können, die Expression der Transkriptionsvarianten 1 und 2 von *DUSP4* zunächst mittels quantitativer Echtzeit PCR in oben genannten Melanomzelllinien untersucht. Die dazu verwendeten Primerpaare detektieren jeweils spezifisch Variante 1 oder Variante 2.

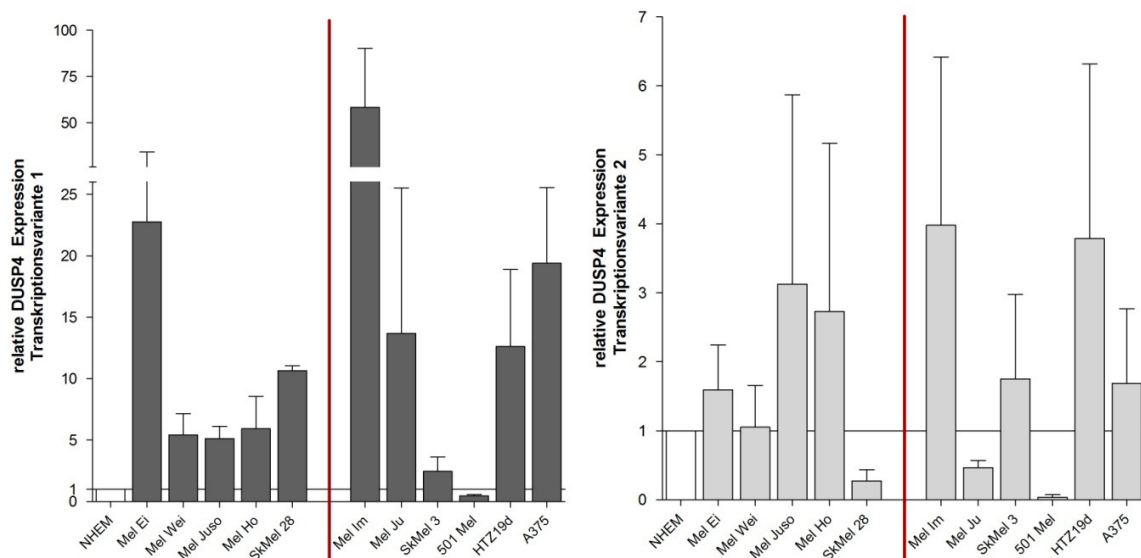


Abbildung 3.2.2: Relative Expression der *DUSP4* Transkriptionsvarianten 1 (Grafik 1) und 2 (Grafik 2) von elf Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM), die bei der Berechnung auf 1 gesetzt wurden. Die vertikale rote Linie trennt die fünf Primärtumorzelllinien von den 6 Metastasenzelllinien. Die horizontale schwarze Linie markiert die Grenze zwischen erhöhter und reduzierter Expression. Graphik 1 enthält bei 25 einen Achsenumbruch in der Y-Achse. Es wurden unterschiedliche Skalierungen der Y-Achsen verwendet (Grafik 1: 0 – 100, Graphik 2: 0 – 7).

Es zeigte sich für beide Transkriptionsvarianten mit Ausnahme weniger Zelllinien eine Erhöhung der relativen Expression von *DUSP4* in Melanomzellen gegenüber normalen humanen epidermalen Melanozyten (Abbildung 3.2.2).

Die Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* zeigte in allen untersuchten Melanomzelllinien, mit Ausnahme von 501 Mel, eine deutlich erhöhte Expression auf bis das 55- fache im Vergleich zu gesunden Melanozyten. Die Expression der *DUSP4* Transkriptionsvariante 1 in 501 Mel Zellen war dagegen auf weniger als die Hälfte von normalen epidermalen Melanozyten reduziert.

Auch für Transkriptionsvariante 2 zeigte die Mehrzahl der untersuchten Zelllinien eine gesteigerte Expression im Vergleich zu gesunden Melanozyten. Reduzierte Expressionen wurden in der Primärtumorzelllinie SkMel 28 und in den Metastasenzelllinien Mel Ju und 501 Mel detektiert.

Insgesamt zeigte die Transkriptionsvariante 2 eine deutlich geringere Erhöhung der relativen Expression auf maximal das 4-fache gegenüber Transkriptionsvariante 1, die meist auf mehr als das 10-fache hochreguliert war. Fasst man die Expressionswerte der hochregulierten Melanomzelllinien zusammen, so ergibt sich für Transkriptionsvariante 1 eine durchschnittliche Erhöhung auf das 15-fache, Transkriptionsvariante 2 dagegen erreicht eine durchschnittliche Erhöhung auf das 2,5-fache verglichen mit gesunden Melanozyten (Abbildung 3.2.3).

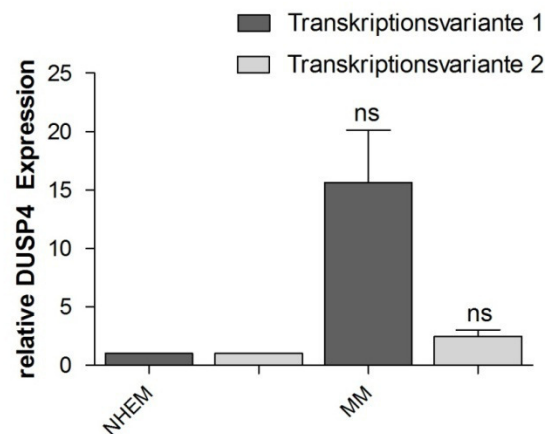


Abbildung 3.2.3: Relative Expression der *DUSP4* Transkriptionsvarianten 1 und 2 als Mittelwert aller zehn Melanomzelllinien (MM) im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM), die bei der Berechnung auf 1 gesetzt wurden. Ns steht für nicht signifikant.

Um die Protein Expression der MAP Kinase Phosphatase DUSP4 zu verifizieren, erfolgte die Detektion der auf mRNA Ebene stärker exprimierten Variante 1 in Protein Lysaten aus Melanomzelllinien mittels monoklonalem Anti-DUSP4 Antikörper im Western Blot.

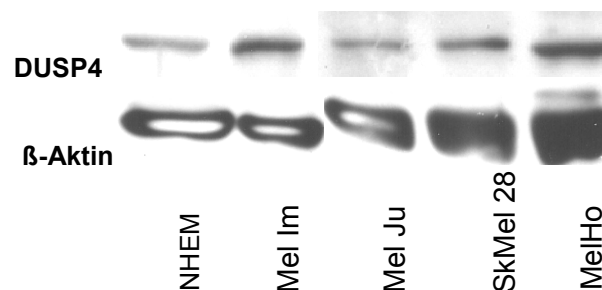


Abbildung 3.2.4: Proteinexpression von DUSP4 Protein Isoform 1 in Protein Lysaten normaler epidermaler Melanozyten (NHEM) und den Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, SkMel 28, Mel Ho und HMB2

In den vier exemplarisch dargestellten Melanomzell Protein Lysaten konnte, verglichen mit Protein Lysat aus Melanozyten, ein stärkeres Signal für DUSP4 detektiert werden (Abbildung 3.2.4).

Auch auf Protein Ebene konnte somit eine gesteigerte Expression der DUSP4 Isoform 1 in Melanomzellen gegenüber gesunden Melanozyten gezeigt werden.

Weiterhin wurden Gewebestanzes aus gesunder Haut, Nävuszellnävus, Primärmelanomen und Melanommetastasen mittels Immunhistochemie auf die Expression von *DUSP4* untersucht. Der hierzu verwendete Anti-DUSP4 Antikörper detektiert die Protein Isoform 1. DUSP4 gehört zu den nukleären Dual-specificity MAP Kinase Phosphatase (Keyse, 2008). Die exemplarisch dargestellten Präparatausschnitte wurden bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Auch hier gilt für alle Schnitte, dass ein Teil des Farbsignals im Zytoplasma der dargestellten Zellen durch das braune Pigment Melanin entsteht und somit als Artefakt zu werten ist.

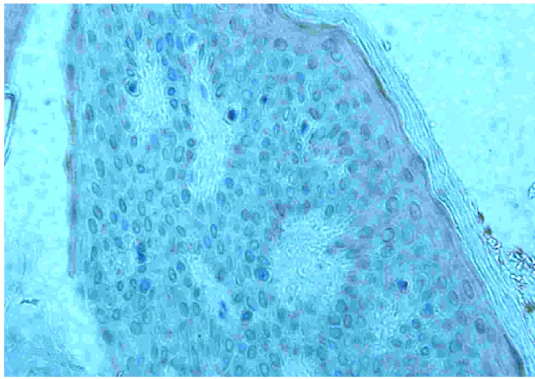
In gesunder Haut stellen sich die Melanozyten in der Basalzellschicht geringfügig dunkler dar als die umliegenden Zellen. Die geringe dunkle Schattierung der Zellkerne zeigt die geringe Expression von DUSP4 (Abbildung 3.2.5: Haut).

Die Nävuszellen (siehe 3.1) zeigen sich insgesamt vor allem im Zytoplasma leicht dunkel gefärbt. Einige wenige Zellkerne weisen ein intensiveres Signal auf, so dass von einer geringen DUSP4 Expression ausgegangen werden kann (Abbildung 3.2.5: Nävuszellnävus).

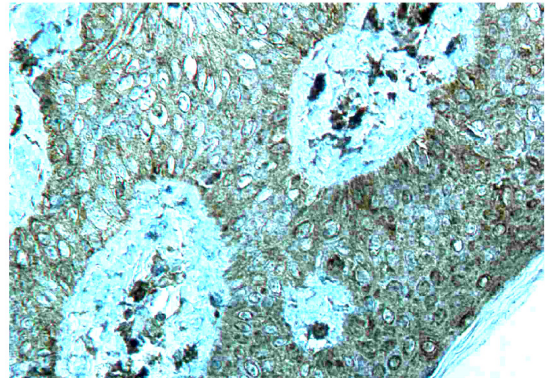
Ein sehr intensives Farbsignal konnte im Primärtumor detektiert werden. Dabei wiesen vor allem die Zellkerne eine starke Färbung auf (Abbildung 3.2.5: Primärtumor). Dies zeigt die starke Expression von DUSP4 in Melanomzellen.

Auch die Melanommetastase zeigte eine intensive Färbung unter Betonung der Zellkerne. Auch hier wird DUSP4 stark exprimiert (Abbildung 3.2.5: Melanommetastase).

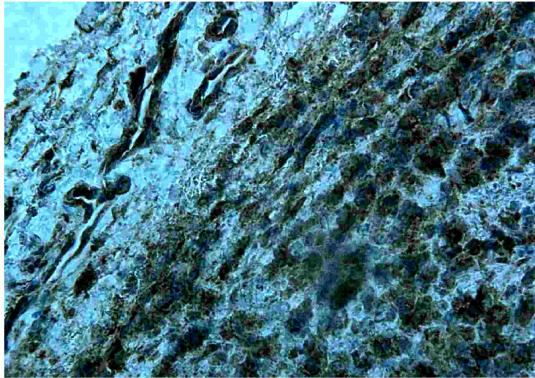
Ausgehend von den Farbintensitäten der Zellkerne zeigte sich sehr deutlich eine gesteigerte DUSP4 Protein Expression in den malignen Zellen des Primärtumors und der Melanommetastase verglichen mit den gesunden Melanozyten. Die Nävuszellen nehmen bezüglich der DUSP4 Expression eine Mittelstellung ein, tendieren aber auf Grund der geringen Farbsignalstärke eher zum Normalbefund gesunder Melanozyten.



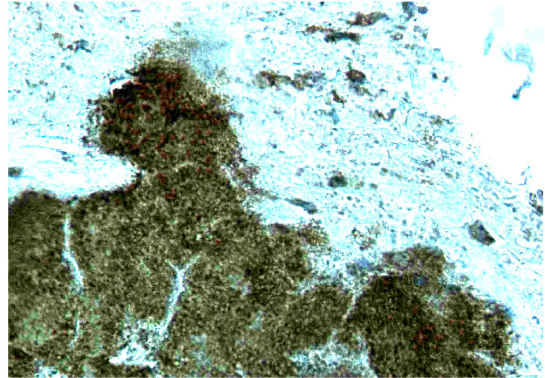
Haut



Nävuszellnävus



Primärtumor



Lungenmetastase

Abbildung 3.2.5: Expression der DUSP4 Protein Isoform 1 in Gewebestanzten aus Haut, Nävuszellnävus, Primärtumor eines malignen Melanoms und einer Lungenmetastase. Immunhistochemisch mit Anti-DUSP4 Antikörper detektiert.

Zusammenfassend zeigte sich für Transkriptionsvariante 1 von DUSP4 und der entsprechenden Protein Isoform 1 eine vermehrte Expression in Melanomzellen gegenüber gesunden Melanozyten auf mRNA und Protein Ebene sowie in Gewebestanzten. Die Transkriptionsvariante 2 zeigte eine nur gering erhöhte mRNA Expression im malignen Melanom.

3.3 Expression des Transkriptionsfaktors ERG in der mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Melanomzelllinie Mel Im

Weiterhin sollte ein negativer Regulator von ERG identifiziert werden. Vielversprechend schien hierfür die miRNA196a2, insbesondere auf Grund ihres in akuter myeloischer Leukämie beschriebenen negativen regulatorischen Effektes auf *ERG* (Coskun et al., 2011).

Dazu wurde die stark *ERG* exprimierende Melanomzelllinie Mel Im stabil mit der miRNA196a2 transfiziert. Als Vektor für die miRNA196a2 wurde der pcDNA3

Vektor verwendet. Um vergleichende Aussagen treffen zu können, wurden weiterhin Mel Im Zellen mit dem leeren pcDNA3 Vektor stabil transfiziert. Die stabil transfizierten Zellen, sowie die daraus gewonnen Materialien (DNA, Protein) wurden mir freundlicherweise von Dr. Simone Braig und Dr. Daniel Müller zur Verfügung gestellt. Abbildung 3.3.1 stellt die relative miRNA196a2 Expression der damit tranfzierten Zellklone gegenüber den mit dem Leervektor transfizierten Zellklonen dar.

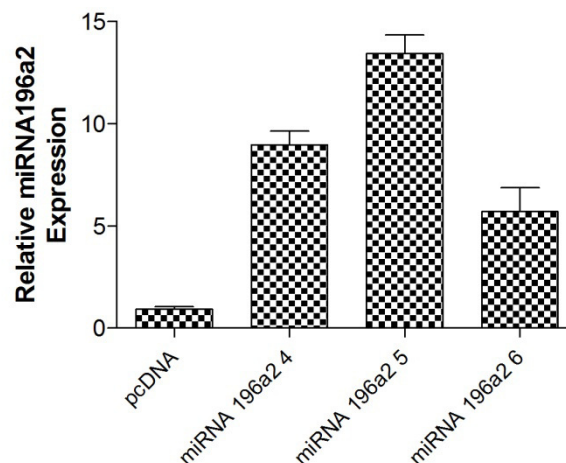


Abbildung 3.3.1: Relative miRNA196a2 Expression in den damit stabil transfizierten Zellklonen (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5, miRNA196a2 6) und den mit Leervektor transfizierten Zellen (pcDNA). Die Berechnung erfolgte im Verhältnis zur Zelllinie Mel Im (nicht dargestellt), die auf 1 gesetzt wurde.

Die Expression des Transkriptionsfaktors ERG in den miRNA196a2 Zellklonen wurde zunächst mittels quantitativer Echtzeit PCR untersucht. Die dazu verwendeten Primerpaare detektieren die Transkriptionsvarianten 1 bis 6 des Transkriptionsfaktors ERG.

In den exemplarisch dargestellten mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Zellklonen zeigte sich eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors ERG (Abbildung 3.3.2). Insbesondere Zellklon 4 zeigte eine Reduktion der *ERG* Expression auf weniger als ein Viertel der Expression des Leervektorzellklons. Fasst man die Expressionswerte der drei miRNA196a2 Zellklone zusammen, so ergibt sich insgesamt eine signifikante Abnahme der *ERG* Expression gegenüber dem Leervektor auf ungefähr die Hälfte.

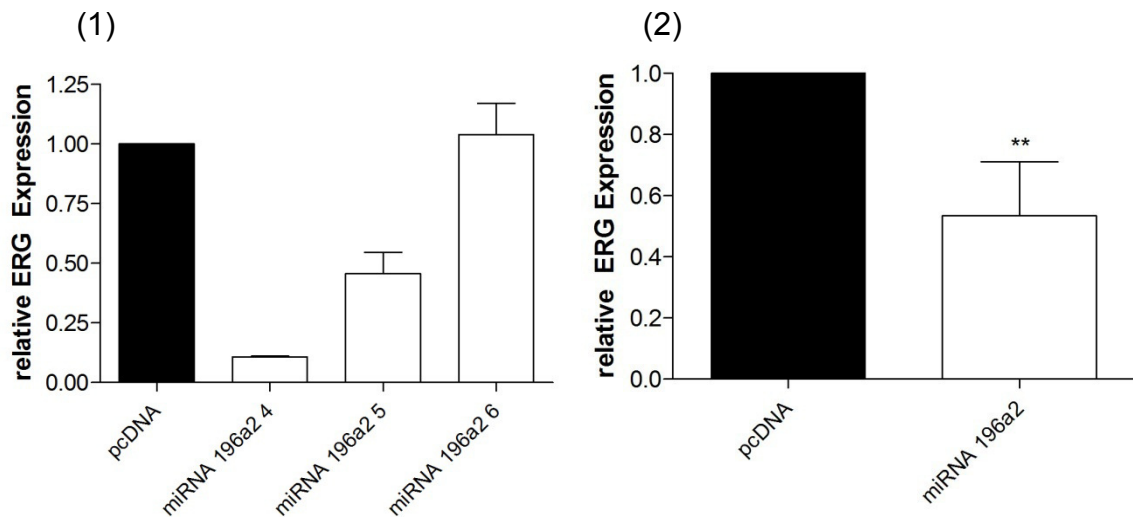


Abbildung 3.3.2: (1) Relative Expression von *ERG* in drei miRNA196a2 Zellklonen (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5, miRNA196a2 6) und dem Leervektorzellklon (pcDNA). (2) Relative *ERG* Expression aller miRNA196a2 Zellklone (miRNA196a2) gegenüber dem Leervektorzellklon (pcDNA). Der Leervektorzellklon wurde bei der Berechnung in beiden Fällen auf 1 gesetzt. Die Sterne * kennzeichnen das Signifikanzniveau.

Weiterhin wurde die Expression des Transkriptionsfaktors *ERG* in Protein Lysaten der stabil transfizierten Zellklone im Western Blot untersucht. Der dabei verwendete Antikörper detektiert die Protein Isoformen 1 bis 3.

Für alle drei miRNA196a2 Zellklone konnte eine reduzierte Bandenintensität, verglichen mit der Bande des Leervektorzellkolons ermittelt werden (Abbildung 3.3.3).

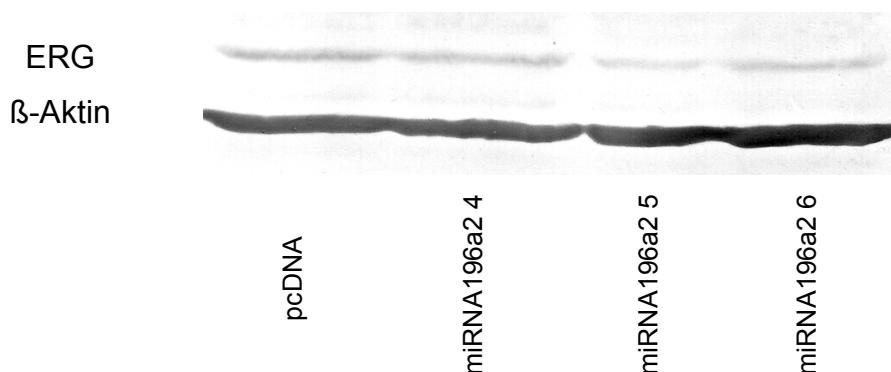


Abbildung 3.3.3: Proteinexpression von *ERG* in Protein Lysaten aus Leervektorzellklon (pcDNA) und den miRNA196a2 Zellklonen (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5 und miRNA196a2 6).

Zur Objektivierung der Intensität der im Western Blot gewonnen Signalbanden erfolgte eine desitrometrische Vermessung, in der eine mehrfach signifikant reduzierte *ERG* Protein Expression in den miRNA196a2 Proteinlysaten gegenüber Leervektor Protein Lysaten verdeutlicht werden konnte (Abbildung 3.3.4).

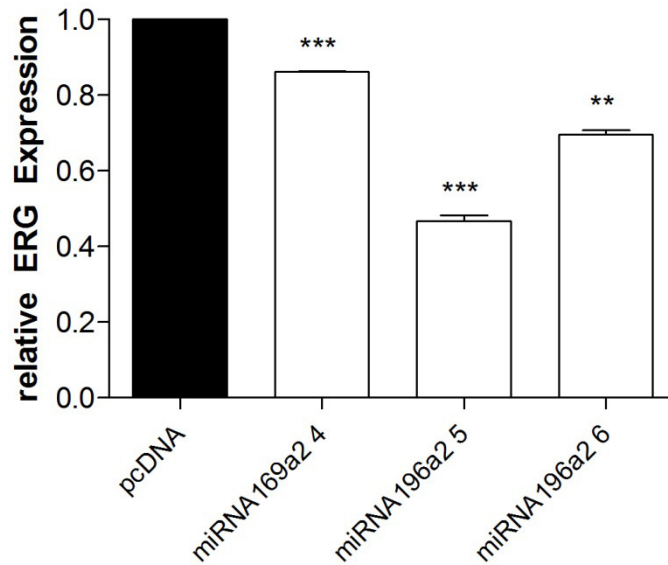


Abbildung 3.3.4: ERG Protein Expression nach densitometrischer Vermessung der Western Blot Proteinbandenintensität der miRNA196a2 Proteinbanden (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5, miRNA196a2 6) und der Leervektorproteinbade (pcDNA). Der Leervektor (pcDNA) wurde bei der Berechnung auf 1 gesetzt. Die Sterne * kennzeichnen das Signifikanzniveau.

Anschließend wurde die ERG Protein Expression in Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Der hierbei verwendete Antikörper detektiert die Protein Isoformen 1 bis 3. Die exemplarisch dargestellten Ausschnitte wurden bei 20-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (Abbildung 3.3.5).

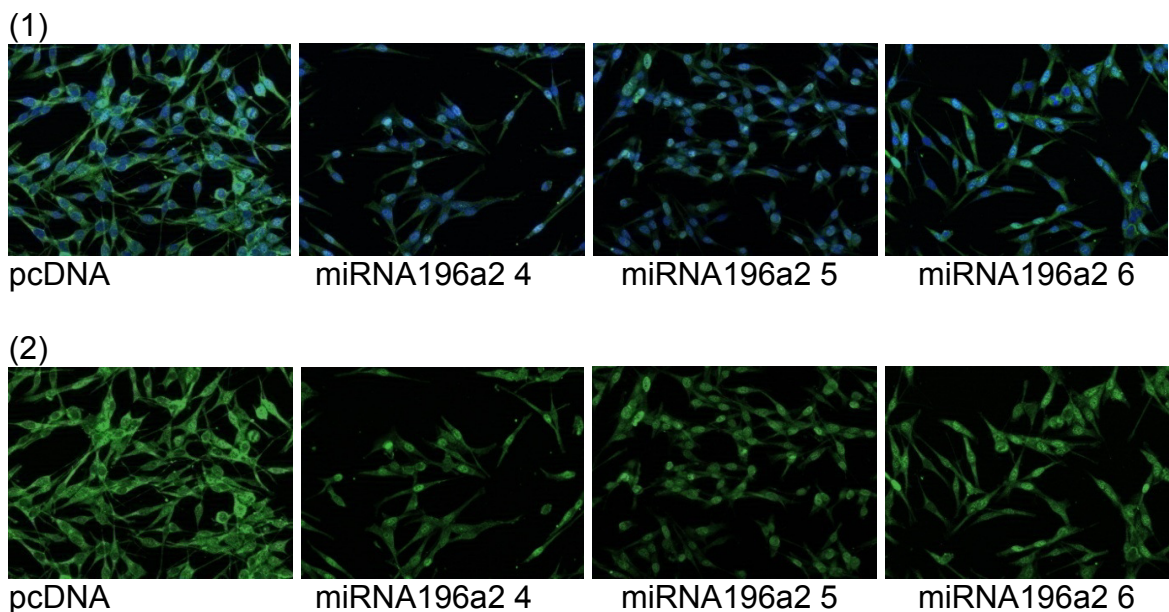


Abbildung 3.3.5: ERG Expression in der Immunfluoreszenz in Melanomzellen transfiziert mit Leervektor (pcDNA) und mit miRNA196a2 (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5, miRNA196a2 6). (1) ERG Signal und Kernfärbung, (2) ERG Signal.

Es wurden jeweils eine Aufnahme, die Kernsignal und Anti-ERG Antikörpersignal zusammen zeigt sowie eine Aufnahme, die ausschließlich das Anti-ERG Antikörpersignal zeigt, angefertigt.

Alle untersuchten Zellen wiesen neben einem deutlichen Signal für ERG im Zellkern eine schwache Färbung des Zytoplasmas auf. Für die mit Leervektor transfizierten Zellen konnte sowohl im Zellkern wie auch im Zytoplasma ein deutlich stärkeres Farbsignal detektiert werden als für die mit der miRNA196a2 transfizierten Zellen (Abbildung 3.3.5). So konnte auch auf zellulärer Ebene eine reduzierte ERG Expression in Melanomzellen, die verstärkt die miRNA196a2 exprimieren, gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigten die mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Melanomzellen gegenüber den mit Leervektor transfizierten Zellen eine deutlich reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors ERG auf mRNA-, Protein- und zellulärer Ebene.

3.4 Expression der *dual-specificity* Protein Phosphatase DUSP4 in der reduziert *ERG* exprimierenden, mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Melanomzelllinie Mel Im

Um unsere These eines direkten regulatorischen Effektes des Transkriptionsfaktors ERG auf *DUSP4* zu untermauern, wurde die *DUSP4* Expression in den miRNA196a2 Zellklonen, die wie oben gezeigt (siehe 3.3) eine reduzierte *ERG* Expression aufweisen, untersucht.

Die Expression der Transkriptionsvarianten 1 und 2 von *DUSP4*, in mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Zellen, wurde zunächst mittels quantitativer Echtzeit PCR untersucht. Dazu wurden die unter 3.3 genannten mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Mel Im Zellklone verwendet.

Die Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* zeigte in den drei exemplarisch dargestellten mit der miRNA196a2 transfizierten Zellklonen eine signifikant reduzierte Expression gegenüber dem mit Leervektor transfizierten Zellklon (Abbildung 3.4.1(1)). Die Zusammenfassung aller miRNA196a2 Zellklone verdeutlicht die um mehr als die Hälfte herabgesetzte *DUSP4* Expression (Abbildung 3.4.1(2)).

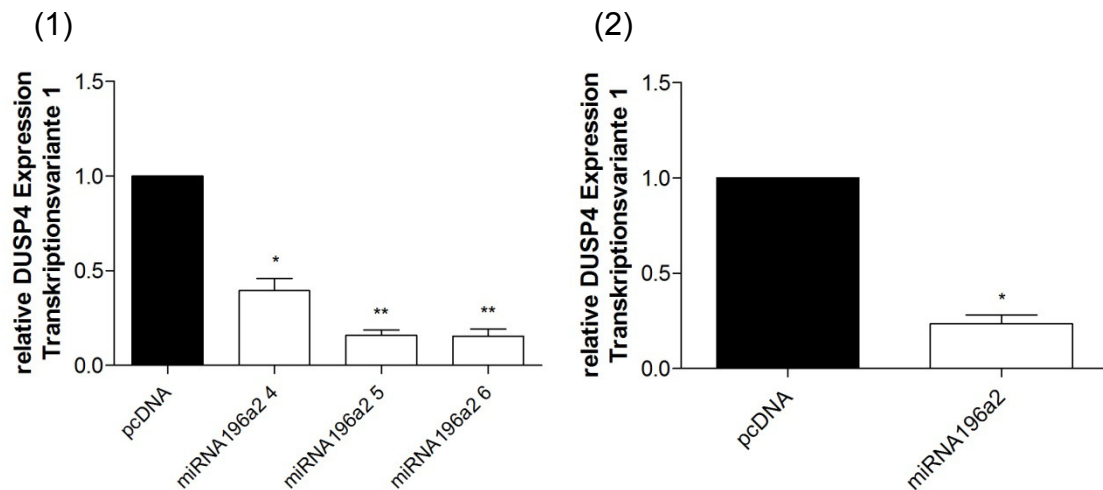


Abbildung 3.4.1: Relative Expression der *DUSP4* Transkriptionsvariante 1 in drei miRNA196a2 Zellklonen (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5, miRNA196a2 6) und dem Leervektorzellklon (pcDNA). (2) Relative *DUSP4* Expression aller miRNA196a2 Zellklone (miRNA196a2) gegenüber dem Leervektorzellklon (pcDNA). Der Leervektorzellklon wurde in beiden Fällen bei der Berechnung auf 1 gesetzt. Die Sterne * kennzeichnen das Signifikanzniveau.

Weiterhin wurde die Expression der *DUSP4* Transkriptionsvariante 2 in den mit der miRNA196a2 stabil transfizierten Zellen untersucht. Zwei der drei miRNA196a2 Zellklone zeigten eine gering reduzierte, nahezu gleiche *DUSP4* Expression im Vergleich zum Leervektorzellklon, während einer der miRNA196a2 Zellklone mehr *DUSP4* als der Leervektorzellklon exprimierte (Abbildung 3.4.2). Für Transkriptionsvariante 2 von *DUSP4* konnte somit keine eindeutige Tendenz des Expressionsverhaltens in den miRNA196a2 Zellklonen gegenüber dem Leervektorzellklon ermittelt werden.

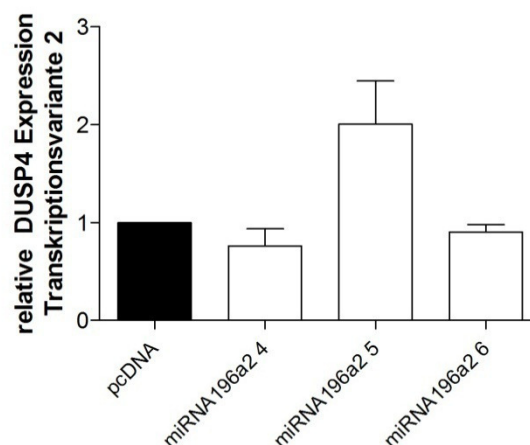


Abbildung 3.4.2: Relative Expression der *DUSP4* Transkriptionsvariante 2 in drei miRNA196a2 Zellklonen (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5, miRNA196a2 6) und dem Leervektorzellklon (pcDNA). Der Leervektorzellklon wurde bei der Berechnung auf 1 gesetzt.

Um den auf mRNA Ebene gezeigte Effekt der miRNA196a2 auf die Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* weiter zu verifizieren, wurden Protein Lysate der stabil tranfizierten Zellklone sowie Proteinlysate aus Leervektorzellen im Western Blot mittels monoklonalem Anti-DUSP4 Antikörper untersucht. Der Antikörper detektiert die Protein Isoform 1.

Protein Lysate der drei mit der miRNA196a2 transfizierten Zellklone zeigten im Vergleich zu Protein Lysat aus Leervektorzellen eine reduzierte Singalbandenintensität für DUSP4 (Abbildung 3.4.3). Auch auf Proteinebene konnte somit eine geringere DUSP4 Expression in den miRNA196a2 Zellklonen detektiert werden.

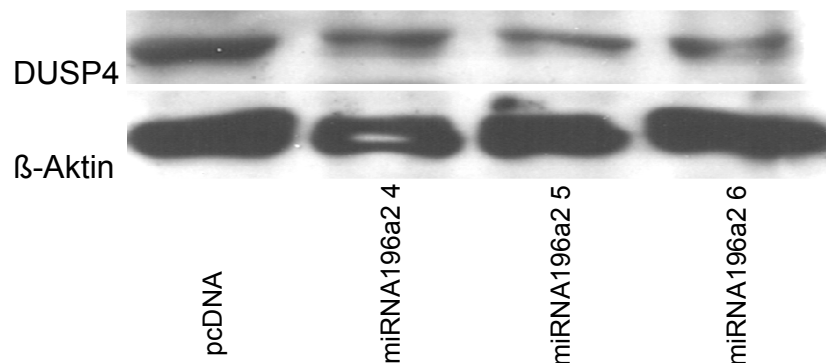


Abbildung 3.4.3: Proteinexpression der DUSP4 Isoform 1 in Protein Lysaten aus Leervektorzellklonen (pcDNA) und den miRNA196a2 Zellklonen (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5 und miRNA196a2 6).

Um die Intensität der Western Blot Signalbanden zu objektivieren, erfolgte die Vermessung mittels Densitrometrie.

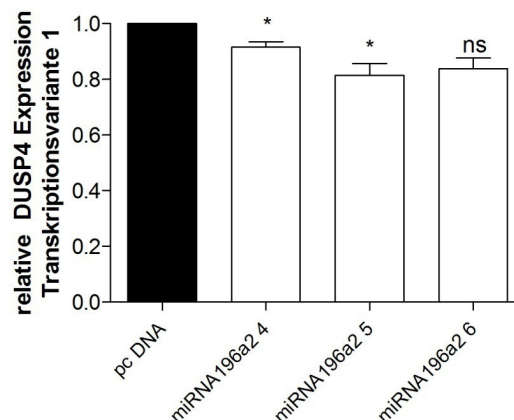


Abbildung 3.4.4: DUSP4 Isoform 1 Proteinexpression nach densitometrischer Vermessung der Western Blot Proteinbandenintensität der miRNA196a2 Proteinbanden (miRNA196a2 4, miRNA196a2 5, miRNA196a2 6) und der Leervektorproteinbade (pcDNA). Der Leervektor (pcDNA) wurde auf 1 gesetzt. Die Sterne * kennzeichnen das Signifikanzniveau, ns steht für nicht signifikant.

Es zeigte sich für alle drei miRNA196a2 Zellklone eine geringere Expression der DUSP4 Protein Isoform 1 gegenüber dem Leervektorzellklon (Abbildung 3.4.4). Zusammenfassend zeigte sich für Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* und der entsprechenden Protein Isoform 1 eine reduzierte Expression in miRNA196a2 Zellklonen gegenüber dem Leervektorzellklon auf mRNA und Protein Ebene. Die Transkriptionsvariante 2 zeigte auf mRNA Ebene keine eindeutige Tendenz. Die DUSP4 Transkriptionsvariante 2 mRNA Expression in den miRNA196a2 Zellklonen unterschied sich kaum zu der des Leervektors.

4 Diskussion

4.1 *ERG* Expression in Melanomzellen unterscheidet sich von der in gesunden Melanozyten

Menschliche Gewebe koexprimieren die Mehrzahl der ETS Transkriptionsfaktoren (Hollenhorst et al., 2004). Einige Tumore und manche Krebszelllinien dagegen exprimieren erhöhte Mengen eines ETS Proteins, oder sogar ETS Faktoren, die im entsprechenden gesunden Gewebe gar nicht vorkommen (Hollenhorst et al., 2011), so dass abweichende Expressionsmuster mit der Entstehung von malignem Gewebe in Verbindung gebracht werden (Seth et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des ETS Faktors *ERG* in gesunden Melanozyten und Melanomzelllinien mittels quantitativer Echtzeit PCR und Immunhistochemie vergleichend untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *ERG* in gesunden epidermalen Melanozyten exprimiert wird, das Expressionsniveau sich aber deutlich von dem der Tumorzelllinien unterscheidet. Ein Teil der untersuchten Zelllinien zeigte auf mRNA Ebene eine deutlich stärkere *ERG* Expression, der andere Teil eine deutlich reduzierte *ERG* Expression. In beiden Fälle ergab sich jedoch eine Abweichung des *ERG* Expressionsniveaus in Melanomzelllinien von dem in gesunden Melanozyten. Dies spricht für einen Zusammenhang zwischen der Entstehung des malignen Melanoms und aberranter *ERG* Expression.

Insbesondere die Überexpression von *ERG* wird mit menschlichen Tumoren in Verbindung gebracht (Sashida et al., 2010). Dazu zählen unter anderem das Prostatakarzinom, das Ewing Sarkom, periphere primitive neuroektodermale Tumore und Malignome des hämatopoetischen Systems wie die AML und die T-ALL (Sashida et al., 2010; Martens, 2011). 50-70 % der Prostatakarzinome zeigen zudem eine Überexpression von weiteren ETS Faktoren in voller Länge oder in Form von Abschnitten in Fusionsproteinen (Tomlins et al., 2005). Dazu zählen *ETV1*, *ETV4* und *ETV5* (Tomlins et al., 2005, 2006; Helgeson et al., 2008). Interessanterweise zeigen mehr als 40% der Melanome ebenfalls eine Überexpression des ETS Faktors *ETV1*, dem eine Rolle als Onkogen im malignen Melanom zugeschrieben wird (Jane-Valbuena et al., 2010). Auch für *ETS1* konnte eine Hochregulation *in vitro* und *in vivo*, sowie eine Beteiligung an der Entstehung

und Invasion im malignen Melanom gezeigt werden (Rothhammer et al., 2004). Weiterhin finden sich in der Literatur Belege für einen Zusammenhang zwischen reduzierter *ERG* Expression und entarteten Zellen. So konnte eine Deletion von *ERG* in Fällen von akuter lymphatischer Leukämie gezeigt werden (Mullighan et al., 2007).

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Melanomzelllinien ergab sich auf mRNA Ebene in einigen Zelllinien eine Überexpression von *ERG*, hingegen in anderen eine deutlich reduzierte Expression im Vergleich zu gesunden Melanozyten, so dass sich hinsichtlich des *ERG* Expressionsniveaus im malignen Melanom zwei unterschiedliche Subgruppen herauskristallisierten. Somit ist davon auszugehen, dass sowohl die Überexpression als auch die reduzierte *ERG* Expression in Zusammenhang mit Mechanismen, die zur Entartung von Melanozyten führen, stehen.

Betrachtet man die Subgruppen genauer, so zeigen drei der fünf Primärtumorzelllinien eine gesteigerte *ERG* mRNA Expression während die aus Metastasen generierten Zelllinien, mit Ausnahme von Mel Im, eine reduzierte *ERG* Expression aufweisen. Zusammengefasst findet man somit in Primärtumorzellen tendenziell eher eine gesteigerte *ERG* Expression, in Metastasenzelllinien dagegen dominiert die reduzierte *ERG* Expression. Hohe *ERG* Expressionslevel in T-ALL (Baldus et al., 2006) und in AML (Marcucci et al., 2005) werden beispielsweise mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Im Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass vor allem die Überexpression von *ERG* das Migrationspotential in RWPE-1 Zellen stark positiv beeinflusst (Hollenhorst et al., 2011). Unsere Ergebnisse weisen auf einen gegenteiligen Effekt im Melanom hin. Reduzierte *ERG* Expression ist hier mit fortgeschrittenem Tumorstadium (Metastasierung) assoziiert.

Somit könnte das *ERG* Expressionslevel zudem ein Marker für die Tumorprogression sein. Erhöhte *ERG* Expression wäre folglich kennzeichnend für ein frühes Tumorstadium, während mit zunehmender Progression dieses Merkmal verloren geht und man in Metastasenzelllinien eine deutlich reduzierte *ERG* Expression beobachtet. Dieses Verhalten zeichnete sich ebenfalls in den Ergebnissen der Immunhistochemie ab. Die bereits auf mRNA Ebene angedeutet Tendenz einer rückläufigen *ERG* Expression mit zunehmender Tumorprogression ließ sich auf Proteinebene in ähnlicher Weise erkennen. In den untersuchten

Gewebestanzen zeigte sich insgesamt eine höhere ERG Proteinexpression in primären Tumorzellen und Metastasen gegenüber gesunden Melanozyten. Die ERG Proteinexpression in Metastasengewebe lag jedoch deutlich unter der in Primärtumorzellen.

Die Immunhistochemie bestätigt zudem, dass die in Melanomzelllinien vermehrt gebildete mRNA auch tatsächlich in ERG Protein, welches die eigentliche Funktion als Transkriptionsfaktor vermittelt, übersetzt wird und eine verstärkte *ERG* Expression in Melanomzellen auch in vivo eine Rolle spielt.

Wie bereits erwähnt, konnte für die ETS Faktoren ETS1 und ETV1 eine Überexpression im malignen Melanom gezeigt und ihre damit verbundenen Rollen als Onkogene durch Beteiligung an Prozessen wie der Tumorentstehung (ETS1 und ETV1) und der Tumordinvasion (ETS1) nachgewiesen werden (Rothhammer et al., 2004; Jane-Valbuena et al., 2010). Betrachtet man die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in den hier untersuchten Zelllinien, so fällt auf, dass besonders hohe Expressionswerte von *ETS1* und *ETV1* vor allem in der Gruppe der Melanomzelllinien, die eine reduzierte *ERG* Expression aufweisen, zu finden sind. Besonders hohe *ETS1* Expression zeigen die wenig *ERG* exprimierenden Zelllinien Mel Ho, SkMel 3 und HTZ19d, aber auch die verstärkt *ERG* exprimierenden Zelllinien Mel Ei und Mel Im (Rothhammer et al., 2004). Für die wenig *ERG* exprimierende Zelllinie 501 Mel konnte eine Amplifikation des *ETV1* Genlokus gezeigt werden, die zu einer besonders hohen Expression dieses ETS Faktors in 501 Mel Zellen führt (Jane-Valbuena et al., 2010). Umgekehrt zeigen die stark *ERG* exprimierenden Zelllinien Mel Wei und Mel Juso eine verhältnismäßig geringe Überexpression von *ETS1* (Rothhammer et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass zelllinien- und damit tumorspezifisch die Überexpression eines der drei genannten ETS Faktoren (ETS1, ETV1, ERG) dominiert. Letztendlich könnte dies bedeuten, dass die Überexpression von ETS Faktoren, je nach dominierendem Faktor, über drei unterschiedliche Wege zur Entartung von Melanozyten führen könnte.

4.2 *DUSP4* als Zielgen von ERG im malignen Melanom

Viele tumorrelevante Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose werden durch MAP Kinasen reguliert (Chang et al., 2001; Davis, 2000;

Johnson et al., 2002; Pearson et al., 2001; Wada et al., 2004). Insbesondere Dauer und Intensität der MAP Kinasen Aktivierung sind wichtige Parameter zur spezifischen Regulation dieser Signalwege (Ebisuya et al., 2005; Murphy et al., 2006; Pouyssegur et al., 2003). DUSPs inaktivieren MAP Kinasen durch Dephosphorylierung an Threonin und Tyrosin-Resten innerhalb des *activation loop* der MAP-Kinasen (Kondoh, 2006). Damit ist klar, dass sie eine wichtige Rolle in der Feinregulation Tumor-relevanter Signalwege spielen.

Wie für den ETS Faktor ERG, konnte auch für *DUSP4* eine abweichende Expression in diversen Tumoren gezeigt werden. So finden sich Überexpressionen von *DUSP4* in Mammakarzinomen (Wang et al., 2003), rektalen Adenokarzinomen (Gaedcke et al., 2010), Pankreaskarzinomen (Yip-Schneider et al., 2001) und kolorektalen Karzinomen (Gröschl et al., 2012). Auffallend war, dass all diese Tumorentitäten Veränderungen in MAP Kinase Signalwegen aufweisen. Brustkrebszellen zeigen eine gesteigerte Expression und Aktivität insbesondere der MAP Kinasen ERK1 und ERK2, aber auch der MAPKs p38 und JNK1 (Wang et al., 2003). Im rektalen Adenokarziom, dem Pankreaskarzinom und dem kolorektalem Karzinom ist die Überexpression von *DUSP4* mit aktivierenden Mutation im MAP Kinase Signalweg wie KRAS und BRAF assoziiert (Gaedcke et al., 2010; Yip-Schneider et al., 2001; Gröschl et al., 2012). 50-70% der Melanome zeigen *Missense*mutationen von BRAF (Davies et al., 2002) und 15% der Melanome weisen Mutationen von NRAS auf (Van't Veer et al., 1989, Albino et al., 1989). In beiden Fällen konnte außerdem eine Überexpression des zytoplasmatischen DUSP6 in Melanomzellen gezeigt werden (Bloethner et al., 2005). Zudem kann *DUSP4* rasch nach ERK Aktivierung induziert werden (Brondello et al., 1997; Misra-Press et al., 1995). So schien eine Fehlregulation von *DUSP4* in Form einer Hochregulation im malignen Melanom zu Beginn der Arbeit sehr wahrscheinlich.

Signalwege wie der MAP Kinase Singalweg kontrollieren die Aktivität, Protein-Interaktionen und die Festlegung von ETS Faktoren auf nachgeschaltete Zielgene (Yordy et al., 2000). ETS Faktoren gelten als nukleäre Effektoren dieser Signaltransduktionspfade und sind so, wie auch DUSP4, mit Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben assoziiert (Yordy et al., 2000). ETS Faktoren wie ERG bewirken mit wenigen Ausnahmen eine Aktivierung der Transkription ihrer Zielgene (Yordy et al., 2000). In Anbetracht der vermuteten

Hochregulation von *DUSP4* in Melanomzellen, schien ERG somit ein möglicher Faktor zur Vermittlung dieses Effektes. Für ein anderes Mitglied der MAP Kinase Phosphatasen, DUSP6, konnte zudem eine ETS Faktor abhängige Regulation gezeigt werden (Ekerot et al., 2008).

Weiterhin werden sowohl ERG als auch DUSP4 eine Beteiligung an der Vermittlung onkogener Effekte zugeschrieben. In *DUSP4* negativen Mäusefibroblasten waren Proliferationsraten reduziert, während die Apoptoseraten erhöht waren (Lawan et al., 2011). Im kolorektalen Karzinom führte die *DUSP4* Überexpression zu einer Zunahme der Zellproliferation (Gröschl et al., 2012). Für ERG konnte gezeigt werden, dass die Überexpression in Prostatazellen das Migrationspotential deutlich verstärkt (Hollenhorst et al., 2011).

4.2.1 *DUSP4* wird durch ETS Faktoren reguliert

Notwendige Voraussetzung für eine Regulation durch ERG war folglich eine ETS Bindestelle in der Promotorregion von *DUSP4*. In der vergleichenden Genomanalyse konnte eine ETS Bindestelle wenige Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt der Transkriptvariante 1 ermittelt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass ETS Faktoren an der Regulation des *DUSP4* Promotors beteiligt sind. Dieses Ergebnis stütze die Hypothese einer positiven Regulation von *DUSP4* durch ERG. Die ermittelte ETS-Bindestelle liegt nur wenige Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt der Transkriptionsvariante 1 und circa 2000 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart der Variante 2.

Eine ras-MAP Kinase abhängige Aktivierung von Zielgenen durch ETS Faktoren erfolgt in der Regel an *ras-responsive elements* (RRE) oder *serum-responsive elements* (SRE), wie zum Beispiel *c-fos*, in der Promotorregion (Wasylyk et al., 1998). Notwendigerweise befindet sich die ETS-Bindestelle dabei in direkter Nachbarschaft zu einer AP-1 Bindestelle (RRE) oder einer Bindestelle für *serum response factor* (SRE) (Wasylyk et al., 1998). Die Promotorregion von *DUSP4* verfügt sowohl über eine Bindestelle für AP-1, sowie mit *c-fos* über ein *serum-responsive element*. Da sich beide aber nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu der identifizierten ETS Bindestelle befinden, kann eine Regulierung des *DUSP4* Promotors durch ETS Faktoren nicht durch RREs oder SREs vermittelt werden. So wird der Effekt folglich wahrscheinlich einzig über die ETS Bindestelle erreicht. Ein Bezug zum MAP Kinase Signalweg ist dennoch nicht ausgeschlossen. So

konnte für *DUSP6* eine ERK abhängige Regulation des Promotors durch ETS1 und ETS2, die nur durch die ETS Bindestelle vermittelt wird, gezeigt werden (Ekerot et al., 2008).

4.2.2 Expression von *DUSP4* im malignen Melanom

Da die ETS Bindestelle im *DUSP4* Promotor einen ersten Hinweis auf eine mögliche Regulation durch ERG gab, wurde nun die Expression von *DUSP4* in Melanomzelllinien untersucht. Dabei wurden beide Transkriptionsvarianten auf mRNA Ebene getrennt voneinander betrachtet. Auf Protein Ebene wurde nur die Isoform 1 von *DUSP4* untersucht.

4.2.2.1 Expression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* im malignen Melanom

Zunächst erfolgt die Interpretation der Ergebnisse für Transkriptionsvariante 1.

Für Transkriptionsvariante 1 zeigte sich mit Ausnahme der Zelllinie 501 Mel eine deutliche Hochregulation in Melanomzellen gegenüber Melanozyten auf mRNA- und Protein Ebene im Western Blot und der Immunhistochemie. Dies spricht wie bei *ERG* für eine Fehlregulation von *DUSP4* in den entarteten Zellen. Zudem steht dieses Ergebnis in Einklang mit im Laufe der Arbeit veröffentlichten Daten, die eine Überexpression von *DUSP4* im malignen Melanom beschreiben (Teutschbein et al., 2010). Die Zelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso und Mel Im, die eine gesteigerte Expression von *ERG* aufweisen, zeigen ebenfalls eine Überexpression von *DUSP4* auf mRNA Ebene. Auch die immunhistochemisch untersuchten Präparate bestätigen einen Zusammenhang. So liegt die *DUSP4* Proteinexpression in Primärtumorzellen und Lungenmetastasengewebe, wie bei *ERG*, deutlich über der in Melanozyten und den benignen Nävuszellen. Weiterhin zeigt die am wenigsten *ERG* exprimierende Zelllinie 501 Mel ebenfalls eine reduzierte *DUSP4* mRNA Expression. Insgesamt weisen somit fünf der untersuchten Melanomzelllinien ähnliche mRNA Expressionsmuster von *ERG* und *DUSP4* auf. Die Ergebnisse der Immunhistochemie bekräftigen weiterhin diesen Zusammenhang und machen damit eine Regulation von *DUSP4* durch *ERG* wahrscheinlich.

Die erhöhte Expression von *DUSP4* in Zelllinien, die eine reduzierte *ERG* Expression aufweisen zeigt, dass auch andere Faktoren in der Regulation von

DUSP4 eine Rolle spielen. Berücksichtigt man die ETS Bindestelle in der Promotorregion, so könnten außerdem weitere ETS Proteine an der veränderten Expression von *DUSP4* in den malignen Zellen beteiligt sein.

Für *ETS1* konnte für die hier untersuchten Melanomzelllinien mit Ausnahme von 501 Mel und A375 (wurden nicht untersucht) eine gesteigerte Expression im Vergleich zu gesunden Zellen gezeigt werden (Rothhammer et al., 2004). Zu den besonders stark *ETS1* exprimierenden Zelllinien gehören neben Mel Ei und Mel Im auch die wenig *ERG* exprimierenden Zelllinien Mel Ho, SkMel 3 und HTZ19d (Rothhammer et al., 2004). So könnte folglich die erhöhte mRNA Expression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* insbesondere in Mel Ho-, SkMel 3- und HTZ19d Zellen, aber auch in den Zelllinien SkMel28 und Mel Ju, in Zusammenhang mit der gesteigerten *ETS1* Expression stehen und über die ETS-Bindestelle eine Hochregulation von *DUSP4* vermitteln.

Auch *ETV1* ist im malignen Melanom überexprimiert (Jane-Valbuena et al., 2010). Besonders hohe Werte zeigt die Zelllinie 501 Mel auf Grund einer Amplifikation des *ETV1* Genlokus auf Chromosom 7, die sie als einzige der untersuchten Zelllinien aufweist (Jane-Valbuena et al., 2010). So könnte die geringe *ERG* mRNA Expression in Zusammenhang mit der besonders ausgeprägten Überexpression von *ETV1* in diesen Zellen stehen und durch Vermittlung eines inhibitorischen Effekts über die ETS Bindestelle Ursache der reduzierten *DUSP4* Expression sein.

Neben ETS Faktoren kommt aber auch die onkogene Aktivierung von BRAF als Ursache erhöhter *DUSP4* Expression im Melanom in Frage. Für das Pankreaskarzinom und das kolorektale Karzinom konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des MEK/ERK-MAP Kinase Signalweges durch onkogenes KRAS und BRAF die Expression von *DUSP4* induziert (Yip-Schneider et al., 2001; Cagnol et al., 2012). Auch in Melanomzelllinien konnte gezeigt werden, dass die Expression von *DUSP4* abhängig von der MEK/ERK Aktivität in Tumorzellen mit BRAF Mutation ist (Pratilas et al., 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Melanomzelllinien weisen mit Ausnahme von HTZ19d alle Mutation im MAP Kinase Signalweg in Form von V600E BRAF auf. So ist die erhöhte *DUSP4* mRNA Expression in den Melanomzelllinien wahrscheinlich unter anderem auf eine Aktivierung des MEK/ERK Singnalwegs durch onkogene Mutation von BRAF zurückzuführen. Dies steht in Einklang mit der erhöhten Expression der

Transkriptionsvariante 1 in den Zelllinien SkMel 28, Mel Ju und A375, die weder eine besonders hohe Expression von *ETS1* noch eine Überexpression von *ERG* aufweisen. Aber auch für die restlichen Zelllinien, die eine Mutation tragen, könnte dies die Ursache der verstärkten *DUSP4* Expression sein. So könnte in den Zelllinien Mel Juso, SkMel 28 und A375 die verstärkte MEK/ERK Aktivierung ausreichend für die gesteigerte *DUSP4* Transkription sein.

Die Hochregulierung von *DUSP4* auf Proteinebene im Western Blot sowie in der Immunhistochemie bestätigt zudem die Beteiligung von ERK an der Regulation von *DUSP4*. So konnte in Brustkrebszellen und Zelllinien eines kolorektalen Karzinoms gezeigt werden, dass *DUSP4* von ERK phosphoryliert wird und dies für die Proteinstabilität notwendig ist (Peng et al., 2010; Cagnol et al., 2012). In Abwesenheit von ERK kommt es zum raschen Abbau von *DUSP4* (Peng et al., 2010; Cagnol et al., 2012).

Die Hochregulierung von *DUSP4* in HTZ19d Zellen zeigt aber, dass die Mutation nicht zwingend für eine verstärkte Expression auf mRNA Ebene benötigt wird, was vermuten lässt, dass die Überexpression von *ETS1* in diesen Zelllinien schon ausreichend sein könnte. Aber auch andere Faktoren, wie zum Beispiel zellulärer Stress kommen in Frage. So kann *DUSP1* beispielsweise durch Stress, unter anderem durch UV-Licht, induziert werden (Li et al., 2001). Da Melanomzellen zahlreichen Stress Faktoren, ausgesetzt sind, könnte auch darin der Grund für die Hochregulierung von *DUSP4* in HTZ19d Zellen liegen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Aktivierung von p53, einem Induktor von *DUSP4*, durch oxidativen Stress (Shen et al., 2006).

ETS Faktoren könnten im Zusammenhang mit einer Mutation im MAP Kinase Signalweg die Expression von *DUSP4* zusätzlich verstärken. So zeigen beispielsweise die Zelllinien Mel Ei und Mel Im, die beide sehr stark *ERG* und *ETS1* exprimieren, die deutlich höchsten *DUSP4* Expressionen auf mRNA Ebene, Mel Im auch auf Protein Ebene. Dies lässt einen synergistischen Effekt zwischen der ETS Überexpression und der BRAF Mutation in der Regulation des *DUSP4* Promotors vermuten. Auch *DUSP6*, dessen Promotor ETS abhängig reguliert wird (Ekerot et al., 2008), ist ein direktes Zielgen von BRAF/MEK *signalling* im Melanom (Packer et al., 2009). In einem anderen Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Bindung von *ETS1* beziehungsweise *ETS2* an der ETS Bindestelle im *DUSP6* Promotor in Verbindung mit ERK Aktivierung steht (Ekerot

et al., 2008). Dieser Zusammenhang könnte auch für die Bindung von ERG und ETS1 am *DUSP4* Promotor gelten und damit die Transkription zusätzlich positiv beeinflussen.

4.2.2.2 Expression der Transkriptionsvariante 2 von *DUSP4* im malignen Melanom

Die Transkriptionsvariante 2 von *DUSP4* wurde ausschließlich auf mRNA Ebene im malignen Melanom untersucht. Insgesamt zeigte sich mit Ausnahme der Zelllinien SkMel 28, Mel Ju und 501 Mel ebenfalls eine Hochregulierung im malignen Melanom, die sich aber im Schnitt auf das 2,5 fache belief und damit deutlich unter der von Transkriptionsvariante 1 (durchschnittlich > 15 fach) liegt. Entscheidend aber ist, dass die Hochregulation der Transkriptionsvariante 2 von *DUSP4* auch unter der von *ERG* in den untersuchten Melanomzellen liegt. Damit ist eine positive Regulation der Transkriptionsvariante 2 durch ERG eher unwahrscheinlich. Im Falle einer positiven Regulation würde man wie bei Transkriptionsvariante 1 eine deutlich höhere Expression der Transkriptionsvariante 2 erwarten.

Erhöhte Level der Transkriptionsvariante 2 wurden auch in Androgenrezeptor unabhängigen Prostatakarzinomzelllinien sowie in epithelialen Brustkrebszelllinien ermittelt (Cadabert et al., 2010), so dass auch die Überexpression der Variante 2 mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht wird. Im malignen Melanom scheint diese Variante aber eine geringere Rolle zu spielen. Die unterschiedlichen Expressionslevel beider Varianten in Melanomzelllinien weisen darauf hin, dass beide einer unterschiedlichen Regulation unterliegen. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen, die zeigen das Variante 2 im Gegensatz zu Variante 1 nur JNK und nicht ERK dephosphorylieren und damit inaktivieren kann und somit eine andere Funktion als Variante 1 vermittelt (Cadabert et al., 2010). So lässt die unterschiedliche Funktion der beiden Varianten auch auf unterschiedliche Regulationsmechanismen schließen. Eine Induktion der Transkriptionsvariante 2 durch ERK und ein Zusammenhang zur BRAF Mutation, wie für Variante 1 gezeigt, scheint daher ebenfalls unwahrscheinlich.

4.3 Expressions- und Promotoranalysen geben Hinweis auf eine direkte Regulation der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* durch ERG im malignen Melanom

Fasst man die bisher diskutierten Ergebnisse zusammen, so fanden sich bezüglich der Expression des Transkriptionsfaktors ERG zwei Subgruppen in den untersuchten Melanomzelllinien, von denen die eine im Vergleich zu Melanozyten eine *ERG* Überexpression, die andere dagegen eine reduzierte *ERG* Expression zeigt. Das abweichende Expressionsniveau in den malignen Zellen lässt für *ERG*, eine Rolle als Onkogen im malignen Melanom vermuten. Zudem deuten die Ergebnisse auf eine rückläufige *ERG* Expression mit zunehmender Tumorprogression hin. Erste Hinweise auf einen regulatorischen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor ERG und *DUSP4* fanden sich nach der Identifikation einer ETS-Bindestelle im *DUSP4* Promotor unmittelbar vor dem Transkriptionsstart der Transkriptionsvariante 1. Der Effekt der ETS Transkriptionsfaktoren wird bei fehlenden SREs und RREs am *DUSP4* Promotor wahrscheinlich einzig über die ETS-Bindestelle vermittelt. Für Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* zeigte sich eine deutliche Hochregulation in den untersuchten Melanomzelllinien und Gewebestanzten gegenüber gesunden Melanozyten, was ebenfalls ein gewisses onkogenes Potential vermuten lässt. Neben der ETS-Bindestelle in der Promotorregion sprechen zudem ähnliche Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene für eine positive Regulation der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* durch ERG. Die erhöhte Expression der Transkriptionsvariante 1 in den wenig *ERG* exprimierenden Zelllinien könnte weiterhin in Zusammenhang mit anderen Faktoren, wie der Überexpression von onkogenem *ETS1*, BRAF Mutationen oder zellulären Stressfaktoren stehen. Zwei Zelllinien weisen zudem auf einen Synergismus zwischen ETS Faktor Überexpression und BRAF Mutation hin. Für Transkriptionsvariante 2 von *DUSP4* zeigte sich ebenfalls eine Hochregulation in Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten, die aber deutlich geringer ausgeprägt war als die Hochregulation von *ERG*. Dies macht eine positive Regulation der Transkriptionsvariante 2 durch ERG sehr unwahrscheinlich.

4.4 Reduzierte Expression der miRNA196a2 im malignen Melanom führt über ERG zu einer Hochregulation der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4*

Um die These einer positiven Regulation von *DUSP4* durch den Transkriptionsfaktor ERG weiter zu verifizieren, wurde nun nach einem negativen Regulator für *ERG* gesucht, um zu untersuchen, ob sich durch die reduzierte *ERG* Expression Änderungen im *DUSP4* Expressionsniveau ergeben.

4.4.1 miRNA196a2 als negativer Regulator von *ERG* im malignen Melanom

MicroRNAs sind kleine, nicht-kodierende, circa 21 Nukleotide lange RNAs, die die Expression von Genen auf posttranskriptionaler Ebene regulieren. Dabei kann das microRNA vermittelte *gene silencing* entweder durch die Destabilisierung der Ziel-mRNA (Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006) oder durch Unterdrückung der Translation erfolgen (Pillai et al., 2007; Standart und Jackson, 2007). Somit erschien diese Gruppe nicht-kodierender RNAs vielversprechend hinsichtlich eines potentiellen negativen Regulators für *ERG*.

Weiterhin sind microRNAs beteiligt an der Regulation vieler biologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Kontrolle des Zellzyklus (Bonazzi et al., 2011). Wie bei dem Transkriptionsfaktor ERG führt eine fehlregulierte Expression von microRNAs zur Entwicklung und Progression von Tumoren. Im Rahmen von Microarray Expressionsanalysen in Melanozyten und Melanomzelllinien konnten in unserer Gruppe zu einem früheren Zeitpunkt 49 microRNAs, die während der frühen Tumorprogression und 11 microRNAs, die in Metastasen verglichen mit Primärtumoren erhöht sind, identifiziert werden (Mueller et al., 2009). Zudem konnte für viele Gene, die eine Rolle in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms spielen, eine Regulation durch microRNAs nachgewiesen werden. So wird beispielsweise MITF, der Hauptregulator von Melanozytenwachstum, Ausreifung, Apoptose und Pigmentierung durch zahlreiche microRNAs darunter auch miR-137 (Bemis et al., 2008) und miR-182 (Segura et al., 2009) reguliert. Das in menschlichen Tumoren häufig fehlregulierte Ras wird unter anderem durch die let-7 Familie reguliert (Johnson et al., 2005). Weiterhin wird Integrin beta 3 durch direkte Interaktion mit einer Bindestelle im Bereich der 3'-untranslatierten Region von der microRNA let-7a reguliert (Mueller und

Bosserhoff, 2008). Der Verlust von let-7a führt zu gesteigerter Integrin beta 3 Expression im malignen Melanom und damit zu einer verstärkten Migrations- und Invasionsfähigkeit (Mueller und Bosserhoff, 2009).

Für eine Regulation des in frühen Tumorstadien hochregulierten ETS Faktors ERG kamen vor allem microRNAs in Frage, die eine reduzierte Expression in Primärtumorzelllinien zeigen.

Besonders vielversprechend schien zu Beginn der Arbeit die miRNA196a. Diese ist zum einen im malignen Melanom *downreguliert* (Braig et al., 2010; Mueller und Bosserhoff, 2011) und steht weiterhin in Verbindung mit der Regulation des ETS Faktors ETS1. Reduzierte miRNA196a Expressionslevel in Melanomzellen führen zu verstärkter Expression von *HOX-B7* und über einen weiteren Zwischenschritt letztendlich zu einer gesteigerten Expression von *ETS1* (Braig et al., 2010). Weitere Hinweise auf eine Regulation von *ERG* durch miRNA196a gaben die Veröffentlichung von Bindestellen für die miRNA196a2 in der 3'-untranslatierten Region von *ERG* (www.mirbase.com) sowie der direkte Nachweis einer negativen Regulation von *ERG* durch miRNA196a in akuter myeloischer Leukämie (Coskun et al., 2010).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen von stabil mit der miRNA196a2 transfizierten Mel Im Zellen zeigten auf mRNA- und Proteinebene im Western Blot und der Immunfluoreszenz eine signifikant reduzierte Expression des ETS Faktors ERG im Vergleich zu den Leervektorzellen. Dabei zeigt der am meisten miRNA196a2 exprimierende Zellklon miRNA196a2 5 die ausgeprägteste Reduktion von ERG in allen Versuchsanordnungen. Diese Ergebnisse sowie die Bindestelle für die miRNA196a2 in der 3'-untranslatierten Region von *ERG* (www.mirbase.com) sprechen für eine direkte negative Regulation des ETS Faktors durch die miRNA196a2. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Effekt umso stärker ausfällt, je mehr miRNA196a2 vorhanden ist, was auf eine inverse Korrelation zwischen der miRNA196a2 und der *ERG* Expression hinweist. Die bereits auf mRNA Ebene reduzierte *ERG* Expression spricht für eine Vermittlung des *gene silencing* Effekts durch Destabilisierung und konsekutivem Abbau der ERG mRNA. Bei einer negativen Regulation durch Suppression der Translation würden man dagegen eher eine reduzierte ERG Expression (bei hohen mRNA Leveln) auf Proteinebene erwarten. Damit konnte die miRNA196a2 als ein direkter negativer

Regulator von *ERG* im malignen Melanom identifiziert werden. Berücksichtigt man, dass die *miRNA196a2* in Melanomzellen deutlich geringer exprimiert wird als in gesunden Melanozyten, so ist die reduzierte Expression dieses negativen Regulators als eine der Ursachen der in den untersuchten Melanomzelllinien gezeigten Hochregulation von *ERG* zu werten (Abbildung 4.4.1).

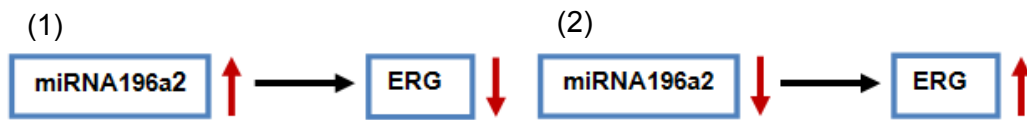


Abbildung 4.4.1: (1) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Erhöhte *miRNA196a2* Werte in stabil damit transfizierten Melanomzellen führen zu einer reduzierten Expression von *ERG*. (2) Schematische Darstellung der Situation im malignen Melanom. Reduzierte *miRNA196a2* Expression führt zu einer Hochregulation von *ERG*.

4.4.2 *miRNA196a2* als indirekter Regulator der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* im malignen Melanom

Mit der Identifizierung der *miRNA196a2* als negativen Regulator von *ERG* ergab sich eine weitere Möglichkeit, die vermutete Regulation der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* durch *ERG* zu verifizieren. Dabei wurde der Effekt der *miRNA196a2* vermittelten reduzierten *ERG* Expression auf die Expression von *DUSP4* untersucht. Stabil mit *miRNA196a2* transfizierte Zellklone zeigten eine signifikant reduzierte Expression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* auf mRNA- und Proteinebene, während für Transkriptionsvariante 2 auf mRNA Ebene keine einheitliche Tendenz ermittelt werden konnte. Weiterhin zeigte der am meisten *miRNA196a2* exprimierende Zellklon 5, genau wie im Falle von *ERG*, stets die geringste Expression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4*. Somit konnte gezeigt werden, dass Zellen, die eine reduzierte *ERG* Expression aufweisen ebenfalls signifikant weniger der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* exprimieren. Für Transkriptionsvariante 2 von *DUSP4* dagegen konnte kein Effekt durch veränderte *ERG* Expression ermittelt werden. In der Regel liegen Bindestellen für miRNAs in den 3'-untranslatierten Regionen der Ziel-mRNAs (Doench und Sharp, 2004; Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005; Grimson et al., 2007; Nielsen et al., 2007). Transkriptionsvariante 1 und 2 von *DUSP4* zeigen bei identischen 3'-untranslatierten Regionen ein unterschiedliches Expressionsverhalten in den verstärkt *miRNA196a2* exprimierenden Zelllinien. Zudem gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine Bindestelle für die *miRNA196a2* an der *DUSP4* mRNA.

Eine direkte Regulation von *DUSP4* durch die miRNA196a2 scheint daher sehr unwahrscheinlich. Vielmehr weist dieses Ergebnis auf einen indirekten Effekt der miRNA196a2 auf Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* über ERG hin. Folglich kann ERG als ein direkter positiver Regulator der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* gewertet werden, der über die ETS-Bindestelle im *DUSP4* Promotor eine Hochregulation vermittelt. Die miRNA196a2 fungiert über die negative Regulation des Transkriptionsfaktors ERG als indirekter negativer Regulator der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4*. Bei im Melanom reduzierten miRNA196a2 Werten ist die Überexpression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* in den untersuchten Melanomzelllinien unter anderem auf die gesteigerte Expression seines positiven Regulators ERG zurückzuführen (Abbildung 4.4.2).

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass niedrige miRNA196a2 Level im malignen Melanom zu einer Hochregulation von *ERG* und folglich zu einer gesteigerten Expression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4* führen. Es ist gelungen eine Folge der im malignen Melanom erniedrigten miRNA196a2 zu klären und einen Weg zu identifizieren, der in der Pathogenese des malignen Melanoms eine Rolle spielen könnte.

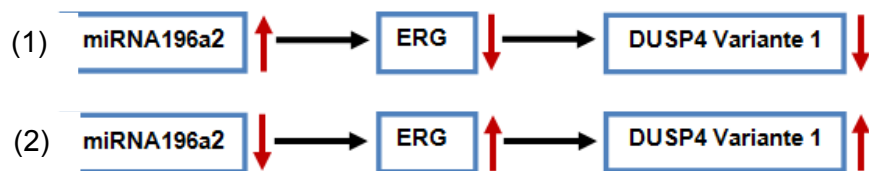


Abbildung 4.4.2: (1) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Erhöhte miRNA196a2 Werte in stabil damit transfizierten Melanomzellen führen zu einer reduzierten Expression von *ERG* und folglich der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4*. (2) Schematische Darstellung der Situation im malignen Melanom. Reduzierte miRNA196a2 Expression führt zu einer Überexpression von *ERG* und konsekutiv zu einer Überexpression der Transkriptionsvariante 1 von *DUSP4*.

5 Literaturverzeichnis

Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: Correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 1989; 4: 1363-1374

Aparicio S, Morrison A, Gould A, Gilthorpe J, Chaudhuri C, Rigby P, Krumlauf R, Brenner S. Detecting conserved regulatory elements with the model genome of the Japanese puffer fish, *Fugu rubripes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995; 92: 1684–1688

Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Houghton AJ, Kirkwood JM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen D, Ross MI, Sober A, Soong SJ, Thompson JA, Thompson JF, Gershenwald JE, McMasters KM. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 2000; 88: 1484-1491

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton AJ, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2001a; 19: 3635-3648

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of Clinical Oncology* 2001b; 19: 3622-3634

Baldus CD, Burmeister t, Martus P, Schwartz S, Gökbuget N , Bloomfield CD et al.. High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute Tölymphoblastic leukemia in adults. *Journal of Cinical Oncology* 2006; 24: 4714-4720

Barsky SH, Sternlicht MD, Safarians S, et al. Evidence of a dominant transcriptional pathway which regulates an undifferentiated and complete metastatic phenotype. *Oncogene* 1997; 15:2077-91

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development* 2006; 20: 1885-1898

Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, Robinson WA. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Research* 2008; 68: 1362:1368

Bonazzi VR, Stark MS, Hayward NK. MicroRNA regulation of melanoma progression. *Melanoma Research* 2012; 22:101- 113

Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010; 24: 538-550

Brennecke J, Stark A, Russel RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology* 2005; 3; 404-418

Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44^{MAPK} cascade. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 1368-1376

Boyle GM, Woods SL, Bonazzi VF, Stark MS, Hacker E, Aoude LG, et al.. Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2011; 24: 525-537

Bushati N, Cohen SM. MicroRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2007; 23: 175-205

Cadalbert LC, Sloss CM, Cunningham MR, Al-Mutairi M, McIntire A, Shipley J, Pelvin R. Differential regulation of MAP kinase activation by a novel splice variant of human MAP kinase phosphatase-2. *Cellular Signalling* 2010; 22: 357 – 365

Cagnol S, Rivard N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* 2012; advanced online publication

Camps M, Nichols A, Gilliereon C, Antonsson B, Muda M, Chabert C, Boschert U, Arkinstall S. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 1998; 280: 1262-1265

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410(6824): 37-40

Charlot C, Dubois-Pot H, Serchov T, Tournette Y, Wasylyk B, et al. A review of post-translational modifications and subcellular localization of Ets transcription factors: possible connection with cancer and involvement in the hypoxic response. *Methods in Molecular Biology* 2010; 647: 3-30

Chen P, Hutter D, Xang X, Gorospe M, Davis RJ, Lui Y. Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 29440-29449

Chitale D, Gong Y, Taylor BS, Broderick S, Brennan C, Somwar R, Golas B, Wang L, Motoi N, Szoke J, Reinersman JM, Major J, Sander C, Seshan VE, Zakowski MF, Rusch V, Pao W, Gerald W, Ladanyi M. An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors. *Oncogene* 2009; 28: 2773–2783

Cortes-Sempere M, Chattopadhyay S, Rovira A, Rodriguez-Fanjul V, Belda-Iniesta C, Tapia M, Cejas P, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Sanchez-Perez I, Nistal M, Moratilla C, Castro-Carpeno JD, Gonzalez-Baron M, Albanell J, Perona R. MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* 2009; 286: 206–216

Coskun E, von der Heide EK, Schlee C, Kühnl A, Gökbüget N, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. The role of microRNA-196a and microRNA196b as *ERG* regulators in acute myeloid leukemia and T-lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 2011; 35: 208-213

Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK, Trojanowska M. Ets1 is an effector of the transforming growth factor (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 20399-20408

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103 (2): 239-252

De Braud F, Khayat D, Kroon BB, et al.. Malignant melanoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2003, 47: 35-63

Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development* 2004; 18: 504-511

Dowd S, Sneddon AA, Keyse SM. Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterization of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1998; 22: 3389-3399

Du T and Zamore P. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132: 4645-4652

Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science* 2005; 118: 2997-3002

Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM, Keenan ID, Dickinson RJ, Storey KG, Keyse SM. Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochemical Journal* 2008; 412: 287-298

Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Current Opinion in Oncology* 2008; 20: 183-189

Filipowicz W. Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature* 2008; 9: 102-114

Gaedcke J, Grade M, Jung K, Camps J, Jo P, Emons G, Gehoff A, Sax U, Schirmer M, Becker H, Beissbarth T, Ried T, Ghadimi BM. Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes, chromosomes & cancer* 2010

Fos. Deutlich mehr maligne Melanome. *www.aerzteblatt.de* 2012; 21.11.2012: 166

Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos H, I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, et al.. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 1995a, 75: 2484-2491

Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos - Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebe W. Primary cutaneous melanoma: Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 1995b; 75: 2492-2498

Garbe C. A rational approach to the follow-up of melanoma patients. *Recent Results Cancer Research* 2002; 160:205-215

Garbe C, Leiter U. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer – the role of sunlight. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2008; 624: 89-103

Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology* 2009, 27(1): 3-9

Gaziel-Sovran A, Segura MF, Di Micco R, Collins MK, Hanniford D, Vega Saenz de Miera E, et al. MiR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell* 2011, 20: 104-118

Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 2006; 27:91-105

Givant-Horwitz V, Davidson B, Goderstad JM, Nesland JM, Trope CG, Reich R. The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2004; 93: 517–523

Grimson A, et al.. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell* 2007; 27: 91-105

Gröschl B, Bettstetter M, Giedl C, Woenckhaus M, Edmonston T, Hofstädter F, Dietmaier W. Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation. *International Journal of Cancer* 2012; doi: 10.1002/ij.27834

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010; 466: 835–840

Haluska F, Pemberton T, Ibrahim N, et al.. The RTK/RAS/BRAF/PI3K pathways in melanoma: biology, small molecule inhibitors and potential applications. *Seminars in Oncology* 2007; 34:546-54

Hamalainen M, Juvonen V, Haikio S, Lakkala T, Johansson J, Pelliniemie TT et al.. ETS-related gene ERG expression in AML patients is significantly associated with NPM1 mutation status. *European Journal of Haematology* 2010; 85: 361-362

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70

Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, Cao X, Singla N, Montie JE, Varambally S et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Research* 2008; 68: 73-80

Hollenhorst PC, Jones DA, Graves BJ. Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors. *Nucleic Acids Research* 2004; 32: 5693-5702

Hollenhorst PC, Shah AA, Hopkins C, Graves BJ. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes & Development* 2007; 21: 1882-1894

Hollenhorst PC, Chandler KJ, Poulsen RL, Johnson WE, Speck NA, Graves BJ. DNA specificity determinants associate with distinct transcription factor functions. *PLoS Genet.* 2009; 5: e1000778. Doi: 10.1371/journal.pgen.1000778

Hollenhorst PC, Ferris WM, Hull MA, Chae H, Kim S, Graves BJ. Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells. *Genes & Development* 2011; 25: 2147-2157

Hsu T, Trojanowska M, Watson DK. ETS proteins in biological control and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 91(5): 896-903

Hutter D, Chen P, Barnes Y, Liu Y. Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphate-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation. *Biochemical Journal* 2000; 352: 155-163

Jané-Valbuna J, Widlund HR, Perner S, et al. An oncogenic role for ETV1 in melanoma. *Cancer Research* 2010; 70: 2075-2084

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298(5600): 1911-1912

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647

Jones-Rhoades M W, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 2006; 57: 19-53

Jung EG, Moll I (Hrsg.): Dermatologie. 5. Auflage. Thieme, Stuttgart 2003

Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, Honda N, Oyama R, Kakimoto A, et al.. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumour marker. *Journal of Dermatological Science* 2011; 61: 187-193

Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2008; 27: 253-261

Kim SC, Hahn JS, Min YH, Yoo NC, Ko YW, Lee WJ. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* 1999; 93: 3893–3899

Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1227-1237

Kunz M.. MicroRNAs in melanoma biology. *Advances in experimental medicine and biology* 2013; 774: 103-120. doi:10.1007/97894-007-5590-1_6

Lawan A, Al-Harhi S, Cadalbert L, McCluskey AG, Shweash M, Grassia G, Grant A, Boyd M, Currie S, Plevin R. Deletion of the dual specific phosphatase-4 (DUSP-4) gene reveals an essential non-redundant role for MAP kinase phosphatase-2 (MKP-2) in Proliferation and Cell Survival. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(15): 12933-12943

Leslie MC, Bar-Eli M. Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. *Journal of Cellular Biochemistry* 2005; 94:25-38

Levy-Nissenbaum O, Sagi-Assif O, Raanani P, Avigdor A, Ben-Bassat I, Witz IP. cDNA microarray analysis reveals an overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia. *Methods in Enzymology* 2003a; 366: 103–113

Levy-Nissenbaum O, Sagi-Assif O, Raanani P, Avigdor A, Ben-Bassat I, Witz IP. Overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia. *Cancer Letters* 2003b; 199: 185–192

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120:12-20

Li J, Gorospe M, Hutter D., Barnes J., Keyse S.M., Liu Y. Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21(23):8213-24

Li R, Pei H, Watson DK, Papas TS. EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene* 2000; 19: 745-753

Liang S, Sharma A, Peng HH, et al.. Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer Research* 2007; 67:5814-20

Liu Y, Lagowski J, Sundholm A, Sundberg A, and Kulesz-Martin M. Microtubule disruption and tumour suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4. *Cancer Research* 2007; 67: 10711–10719

Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, et al.. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocrine-Related Cancer* 2001; 8:219-25

Martens JHA. Acute myeloid leukemia: A central role for the ETS factor ERG. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011; 43: 1413-1416

Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25:3337-3343

Matsuguchi T, Musikacharoen T, Johnson TR, Kraft AS, Yoshikai Y. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharid-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines. *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21: 6999-7009

Mazar J, Deblasio D, Govindarajan SS, Zhang S, Perera RJ. Epigenetic regulation of microRNA-375 and its role in melanoma development in humans. *FEBS Letters* 2011; 585: 2467-2476

Mazar J, Khaitan D, Deblasion D, Zhong C, Govindarajan SS, Kopanathi S, et al.. Epigenetic regulation of MicroRNA genes and the role of miR-34b in cell invasion and motility in human melanoma. *PLoS One* 2011; 6: e24922

Melnikova VO, Bar-Eli M. Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. *Cancer Biology & Therapy* 2008; 7:7: 997-1003

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al.. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436:720-4

Miller AJ, Mihm MC Jr.. Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2006; 355: 51-65

Misra-Press A, Rim CS, Yao H, Roberson MS, Stork PJ. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 14587-14596

Mueller BU, Pabst T, Osato M, et al.. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukaemia. *Blood* 2002; 100: 998-1007

Mueller DW, Bosserhoff AK. Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene* 2008; 6689-6706

Mueller DW, Bosserhoff AK. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. *British Journal of Cancer* 2009; 101: 551-556

Mueller DW, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. *International Journal of Cancer* 2011; 129: 1064-1074

Mueller DW, Rehil M, Bosserhoff AK. MiRNA Expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and progression of malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129:1740-1751

Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al.. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446: 758-764

Murphy LO, Belnis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences* 2006; 31: 268-275

Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, Sim MS, Turner RR, Morton DL, Hoon DS. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumour-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics* 2011; 6: 388-394

Nielson CB et al.. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* 2007; 13: 1894-1910

Nyormoi O, Bar-Eli M. Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clinical and Experimental Metastasis* 2003; 20:251-63

Oikawa T, YamadaT. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 2003; 303: 11–34

Okudela K, Yazawa T, Woo T, Sakaeda M, Ishii J, Mitsui H, Shimoyamada H, Sato H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Takahashi T, Sugimura H, Kitamura H. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *American Journal of Pathology* 2009; 175: 867–881

Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signaling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 2007, 26(22); 3203-3213

Packer LM, East P, Reis-Filho JS, Marais R. Identification of direct transcriptional targets of ^{V600E}BRAF/MEK signalling in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2009; 22: 785-798

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 2001; 22(2): 153-183

Pei H, Yordy JS, Lenge Q, Zhao Q, Watson DK. EAPII interacts with Ets1 and modulates its transcriptional function. *Oncogene* 2003; 22: 2699-2709

Peng DJ, Zhou JY, Wu GS. Post-translation regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 (MKP-2) by ERK. *Cell Cycle* 2010; 9:23: 4650-4655

Peters L and Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular Cell* 2007; 26: 611-623

Pillai RS, Bahattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology* 2007; 17: 118-126

Poser I, Bosserhoff AK. Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histology and histopathology* 2004; 19: 173-188

Pouyssegur J, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling. *European Journal of Biochemistry* 2003; 270: 3291-3299

Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander D, Solit DB, Rosen N. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106: 4519-4524

Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8: 23-36

Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 1996; 21: 267-271

Rothhammer T, Hahne JC, Florin A, Poser I, Soncin F, Werneret N, Bosserhoff AK. The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004; 61: 118-128

Sanchez-Perez I, Martinez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*, 2000; 19: 5142–5152

Sala E, Mologni L, Truffa S, et al.. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Molecular Cancer Research* 2008; 6:751-9

Sashida G, Bazzoli E, Menendez S, Liu Y, Nimer SD. The oncogenic role of the ETS transcription factors MEF and ERG. *Cell Cycle* 2010; 9(17): 3457-3459

Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, Zakrezewski J, Blochin E, Rose A, Bogunovic D, Polsky D, Wei J, Lee P, Belitskaya-Levy I, Bhardwaj N, Osman I, Hernando E. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106: 1814-1819

Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *European Journal of Cancer* 2005; 41: 2462-2478

Shen WH, Wang J, Wu J et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2: A novel transcription target of p53 in apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66: 6033-6039

Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Research* 2007; 67: 4459–4466

Standart N, Jackson RJ . MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes & Development* 2007; 21: 1975-1982

Taoudi S, Bee T, Hilton A, Kneszevic K, Scott J, Willson TA, et al.. ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification. *Genes & Development* 2011; 25: 251-262

Teutschbein J, Haydn JM, Samans B, Krause M, Eilers M, Scharl M, Meierjohann S. Gene expression analysis after receptor tyrosine kinase activation reveals new potential melanoma proteins. *BMC Cancer* 2010; 10:386

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R et al..Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644-648

Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D. TMPRSS2: ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Research* 2006; 66:3396-3400

Tsujita E, Taketomi A, Gion T, Kuroda Y, Endo K, Watanabe A, Nakashima H, Aishima S, Kohnoe S, Maehara Y. Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2005; 69: 342–347

Tuveson DA, Weber BL, Herlyn M. BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. *Cancer Cell* 2003; 4:95-8

Uribe P, Wistuba II, Gonzalez S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *The American Journal of Dermatopathology* 2003; 25:365-70

Van't Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, et al. N-ras mutations in human cutaneous melanoma form sun-exposed body sites. *Molecular and Cellular Biology* 1989; 9: 3114-3116

Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004; 23(16): 2838-2849

Wang H, Cheng Z, Malbon CC. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Letters* 2003; 191: 229-237

Wang Z, Zhou JY, Kanakapalli D, Buck S, Wu GS, Ravindranath Y. High level of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression is associated with cisplatin resistance in osteosarcoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 2008; 51: 754–759

Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 1998; 23(6): 213-216

Wei GH, Badis G, Berger MF, Kivioja T, Palin K, Enge M, Bonke M, Jolma A, Varjosalo M, Gehrke AR, et al.. Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *European Molecular Biology Organisation* 2010; 29: 2147-2160

Wu JJ, Zhang L, Bennett AM. The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphate 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25: 4792-4803

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103: 4034-4039

Xu S, Furukawa T, Kanai N, Sunamura M, Horii A. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Journal of Human Genetics* 2005; 50: 159–167

Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, et al.. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *Journal of Investigative Dermatology* 2003; 121:1160-2.

Yip-Schneider MT, Lin A, Marshall MS. Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 280:992-997

Yordy JS, Muise-Helmericks RC. Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 2000; 19: 6503-6513

Zhang Q, Muller M, Chen CH, Zeng L, Farooq A, Zhou MM. New insights into the catalytic activation of the MAPK phosphatase PAC-1 induced by its substrate MAPK ERK2 binding. *Journal of Molecular Biology* 2005; 354: 777-788

Webseiten

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

www.mirbase.com

Danksagung

Zu erst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Bosserhoff bedanken, die mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in ihrer Abteilung zu erstellen und stets für Fragen und Anregungen offen war.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Alexandra Denk, die mir während des experimentellen Teils der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir geduldig eine exzellente Einarbeitung in die Methoden ermöglichte.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Simone Braig und Dr. Daniel Müller bedanken, die mir einen Teil der Materialien zu Verfügung gestellt haben.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Benedikt Gröschl für die kollegiale Zusammenarbeit und die Bereitstellung eines Antikörpers für Proteinexpressionsanalysen.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitglieder der AG Bosserhoff die mich herzlich aufgenommen und stets ein offenes Ohr für Fragen hatten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Stephanie Wagner
Anschrift St. Andreas-Straße 7
92421 Schwandorf
Telefon +49 9431 8714
E-Mail wagner.stephanie.2406@web.de
geboren am 24. Juni 1986 in Sulzbach-Rosenberg, ledig



Studium/ Beruf:

03/2013 bis dato Assistenärztin für Innere Medizin am Klinikum St. Marien Amberg
11/2012 bis 02/2013 Assistenzärztin für Pathologie an der Universität Regensburg
10/2005 bis 06/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
03/2011 bis 01/2012 Praktisches Jahr am Klinikum St. Marien Amberg
02/2011 Praktikum am Klinikum Longgang, Shenzhen, China, im Rahmen des Austauschprogramms des Universitätsklinikums Regensburg
03/2009 bis dato experimentelle Doktorarbeit, Abteilung für Molekulare Pathologie, Universität Regensburg
03/2010 Famulatur am Stadtspital Triemli, Zürich, Pathologie
09/2009 Famulatur am Mater Dei Hospital, Malta, Kardiologie
08/2008, 03/2009 Famulatur in der Praxis Dres Pöllath & Scherer, Sulzbach-Rosenberg, v.a. Hand- und Hernienchirurgie
09/2008 Famulatur am Kaiserin Elisabeth Spital, Wien, Chirurgie

Schulbildung:

1996 bis 2005 Herzog-Christian-August Gymnasium, Sulzbach-Rosenberg (Abiturnote 1,1)
1992 bis 1996 Pestalozzi Grundschule, Sulzbach-Rosenberg

Aktivitäten:

2009 bis 2010 Studentische Hilfskraft am Studiendekanat für Humanmedizin
2006, 2008, 2009 Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, Prüfungsvorbereitung für makroskopische und mikroskopische Anatomie